Präparative Isolierung von Oligoribouridylsäuren aus RNA-Hydrolysaten

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Heidereich v. Biedersee
aus Tübingen

1987

UNIV.
LIBRARY
IOWA

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0122

Präparative Isolierung von Oligoribouridylsäuren aus RNA-Hydrolysaten

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Heidereich v. Biedersee
aus Tübingen

1987

Tag der mündlichen Prüfung: 18. September 1987

Dekan:	Prof. Dr. D. Mecke
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Schott
2. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. H. Eckstein

Den Familien

Didici in mathematicis ingenio,
in natura experimentis,
in legibus divinis humanisque auctoritate,
in historia testimoniis nitendum esse

G.W. Leibniz.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1985 bis April 1987 unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. H. Schott

am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Schott für die Stellung des Themas, für viele Anregungen und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. habil. H. Eckstein und Herrn Dipl.-Chem. T. Haug danke ich für wertvolle Hinweise im Zusammenhang mit HPLC-Analysen.

INHALT

Abkürzungen 5

A Einleitung und Problemstellung 7

B Allgemeiner Teil 9

1 Methoden zur selektiven Partialhydrolyse von RNA 9

1.1 Chemische Spaltung 11

1.1.1 Saure Hydrolyse 11

1.1.2 Methylierung von Guanosin mit Schwefelsäuredimethylester (DMS) und Aminolyse 13

1.1.3 Adenosinspaltung mit Diethyldicarbonat (DEP) und Aminolyse 14

1.2 Methylenblau- und riboflavinsensibilisierte photodynamische Oxidation der Purinbasen 15

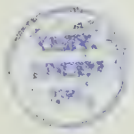
1.3 Enzymatische Spaltung der RNA mit Ribonucleasen 17

1.3.1 RNA-Partialhydrolyse an Guanosinmonomereinheiten unter Bildung von $(A/C/U)_n$Gp-Oligomeren und Gp 17

1.3.2 RNA-Partialhydrolyse an Adenosin- und Guanosinmonomereinheiten unter Bildung von $(C/U)_n(A/G)$p-Oligomeren und Ap, Gp 18

1.4 Terminale Spaltungen an RNA und Oligoribonucleotiden 18

1.4.1 Alkalische Phosphatase (52) 18



1.4.2 Oxidation der 3'-terminalen Riboseeinheit mit IO_4^- und Eliminierung nach Bildung einer Schiffschen Base 19

2 Darstellung von U_n durch Partialhydrolyse von RNA und chromatographische Isolierung der Fragmente 21

3 Präparative Durchführung der Darstellung von U_n aus RNA 24

3.1 Darstellung und Isolierung von Oligouridylsäure-3'-purinnucleotiden (U_nRp) 24

3.2 Darstellung von Oligouridylsäuren aus U_nRp 34

3.3 Reinheitskontrolle der Oligouridylsäuren mit HPLC an reverser Phase und präparative Nachreinigung 47

3.4 Kontrolle an HPLC der Kettenlänge und der homologen Nucleosidzusammensetzung durch enzymatischen Abbau mit Phosphodiesterase und Phosphatase 55

C Experimenteller Teil 58

1 Geräte und Material 58

2 Methoden 59

2.1 Papierchromatographie 59

2.2 Säulenchromatograpie an QAE-Sephadex A-25 59

2.2.1 Säulenpacken (69) 59

2.2.2 Probenauftrag 60

2.2.3 Linear steigende Gradientenelution 60

2.2.4 Equilibrieren in der Säule 60

2.2.5 Regenerieren von QAE-Sephadex A-25 60

2.3 Gelchromatographie an Sephadex G-10 bzw. G-15 (70) 61

2.4 Puffer 61

2.4.1 1 M Cyclohexylammoniumacetat 61

2.4.2 1 M Piperidiniumacetat pH 8,2 61

2.4.3 0,1 M Aniliniumchlorid in 0,33 M Natriumacetat pH 5,0 62

2.4.4 1 M Lysin-HCl/0,025 M $NaIO_4$ 62

2.4.5 0,1 M Glycin-NaOH pH 10,3 62

2.4.6 0,25 M Tris-HCl pH 8,6 62

2.5 Methylierung von Guanosin in RNA mit DMS und Aminolyse 62

2.6 Adenosinspaltung in RNA mit DEP und Aminolyse 63

2.7 Photodynamische Oxidation von Purinbasen in RNA mit Methylenblau und Riboflavin 63

2.8 Enzymatische Partialhydrolyse der RNA mit RNase T_1 und chromatographische Trennung (Schritt I. in Schema 3) des Partialhydrolysates (48) 64

2.9 Enzymatische Spaltung der RNA-Fragmente der 0,3 M-, 0,5 M- und 1 M Fraktion aus 2.8 mit RNase U_2 (51) zu Oligopyrimidinnucleotid-3'-purinnucleotiden 65

2.9.1 Chromatographische Auftrennung der RNase U_2-gespaltenen 1 M Fraktion und erneute RNase U_2-Spaltung 65

2.10 Desaminierung (65) und chromatographische Auftrennung der nach der RNase U_2-Spaltung erhaltenen RNA-Fragmente 66

2.11 Abspaltung der 3'-terminalen Phosphatgruppe und chromatographische Reinigung 67

2.12 Perjodatspaltung mit Eliminierung des 3'-terminalen Nucleosides (62) 68

2.12.1 68

2.13 Reinheitskontrolle und Nachreinigung mit Reversed-Phase HPLC 68

2.14 Kontrolle der Kettenlänge und der Nucleosidzusammensetzung durch enzymatischen Abbau und HPLC 69

D Diskussion 70

E Zusammenfassung 74

F Literatur 75

Abkürzungen

Die Abkürzungen befolgen prinzipiell IUPAC-IUB Regeln für Nucleinsäuren (Eur. J. Biochem., 15 (1970) 203) bzw. das SI-Einheitensystem (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 358 (1977) X - XIV).

A	Adenosin
A_{260}-Einheit	Nucleotid-Menge in 1 cm^3 Solvens, die bei einer Schichtdicke von 1 cm bei 260 nm die Absorption 1 ergibt.
C	Cytidin
DEP	Diethyldicarbonat (Diethylpyrocarbonat)
DMS	Schwefelsäuredimethylester (Dimethylsulfat)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
G	Guanosin
Hyp	Hypoxanthin
I	Inosin
kat	Katal, SI-Einheit für die katalytische Aktivität $\hat{=}$1 mol/s, (1U=16,67 nkat)
M	Molarität (statt der SI-Einheit mol/l)
N	unbestimmtes Nucleosid
R	unbestimmtes Purinnucleosid
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
t_0	Totzeit
t_R	Retentionszeit
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol, (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)
U	Uridin
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbares Licht
X	Xanthosin
Xan	Xanthin
Y	unbestimmtes Pyrimidinnucleosid

A Einleitung und Problemstellung

Die großen Fortschritte in der Synthese von DNA haben zu einer stürmischen Entwicklung der Molekularbiologie geführt, während sich bei der Synthese von RNA in den vergangenen Jahren keine wesentliche Verbesserungen erzielen ließen (1-4).

Die chemische Synthese von Oligoribonucleotiden wird nach der Triestermethode analog der Oligodesoxyribonucleotidsynthese durchgeführt (5-7). Der Schutz der 2'-Hydroxylfunktion der Ribose erfordert einen deutlich höheren Syntheseaufwand im Vergleich zur Oligodesoxyribonucleotidsynthese. Außerdem muß wegen der leichten chemischen und enzymatischen Hydrolysierbarkeit der RNA die Synthese äußerst sorgfältig durchgeführt werden und ist daher sehr zeitaufwendig. Seit kurzem werden Oligoribonucleotide auch mit der Festphasensynthese an Controlled Pore Glass (CPG) dargestellt (8). Die Ausbeuten liegen hier noch bei ca. 200 nmol/g Träger.

Eine weitere Möglichkeit, Oligoribonucleotide herzustellen ist die enzymatische Synthese (9,10). Kurze RNA-Fragmente mit freier 3'-Hydroxylfunktion wirken als Primer, die mit Polynucleotid Phosphorylase verlängert werden können. Eine gezielte Verlängerung ist nur mit 3'-blockierten Monomereinheiten möglich (11). Um Polykondensation zu verhindern, müssen spezielle Enzyme verwendet oder das Enzym teilweise denaturiert werden (12,13). Eine gezielte Kopplung zweier Oligomere ist mit T4 RNA Ligase möglich (14,15). Dieses Enzym koppelt ein Donormolekül $pN_n(B)$ mit einem Akzeptormolekül N_m zu $N_mN_n(B)$. Die Blockierung (B) (im einfachsten Fall ein 3'-Phosphat) verhindert, daß weder das Donormolekül, noch das Endprodukt auch als Akzeptor wirken können. Nach Entfernung von (B) oder Phosphorylierung der 5'-Position mit Polynucleotid Kinase kann das Produkt weiter verlängert werden. Der enzymatische Aufbau von Oligonucleotiden kann nur in analytischen Mengen durchgeführt werden (15).

Eine Alternative zur Synthese von Oligonucleotiden bildet die Partialhydrolyse und die anschließende chromatographische Isolierung definierter Fragmente. Hierbei werden bestimmte Monomereinheiten im Nucleinsäurenstrang chemisch oder enzymatisch selektiv gespalten (16).

In Arbeiten mit DNA wurden Oligomere mit homologen (17,18) und gemischten (19-22) Sequenzen in präparativen und analytischen Mengen isoliert. Analoge Untersuchungen mit RNA wurden bisher nur im analytischen Maßstab durchgeführt: Durch enzymatische Spaltung (23,24) bzw. zur Sequenzermittlung mit unvollständiger chemischer Partialhydrolyse (25-27). In der vorliegenden Arbeit soll RNA depuriniert und, nach Desaminierung, Oligouridylsäuren definierter Kettenlänge chromatographisch isoliert werden. Hierzu wird untersucht, welche Purinspaltungen bei RNA präparativ möglich sind. Die Depurinierung von RNA ist wesentlich problematischer als bei der DNA (16): Reaktionsgeschwindigkeiten können sich bei der RNA im Vergleich zur DNA um mehrere Zehnerpotenzen unterscheiden; bei chemischen Modifizierungen und damit leichterer Hydrolysierbarkeit der Purinbasen können andere und mehr Nebenprodukte in der RNA auftreten; Depurinierungen, die bei Ribonucleosiden und -nucleotiden gelingen, verlaufen bei der RNA meist nur langsam und mit einem höheren Anteil an Nebenprodukten. Da sich Nebenprodukte aus Oligonucleotiden, wenn überhaupt, nur schwer abtrennen lassen, müssen die Depurinierungsreaktionen selektiv verlaufen.

B Allgemeiner Teil

1 Methoden zur selektiven Partialhydrolyse von RNA

Reaktionen, die eine gezielte Partialhydrolyse der RNA erlauben (16), können in drei Gruppen unterteilt werden:

- chemische Modifikation der Nucleobasen und anschließende Hydrolyse,
- photokinetische Reaktion,
- enzymatische Spaltung.

Diese Reaktionen werden im präparativen Maßstab auf ihre Eignung zur Depurinierung von RNA geprüft.

Eine einfache Möglichkeit der Reinheitskontrolle bzw. der Analyse der anfallenden Gemische ist die Bestimmung der UV-Verhältnisse. Die UV-Verhältnisse werden bei Nucleotiden durch Bildung des Quotienten von der Absorption bei einer Wellenlänge zu der Absorption bei 260 nm bestimmt. Als Dividenten werden bei unsubstituierten Nucleotiden die Absorptionen bei 250, 280 und 290 nm verwendet (28). Die Absorptionen werden bei pH 7 und, falls erforderlich, zusätzlich im Sauren und Alkalischen bestimmt.

Der molare Extinktionskoeffizient von Oligonucleotiden setzt sich unter Vernachlässigung der chromatischen Effekte additiv aus den molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen Monomerbausteine zusammen. Die UV-Verhältnisse eines Oligonucleotides lassen sich daher folgendermaßen formulieren:

$$v_y = \frac{\sum a_{Mi}(y)\ x_i}{\sum a_{Mi}(260)\ x_i}$$

v = UV-Verhältnis
y = 250, 280 oder 290 nm
$a_{Mi}(y)$ = molarer Extinktionskoeffizient des Nucleotides i bei der Wellenlänge y
x_i = Molenbruch des Nucleotides i

Mit bekannten molaren Extinktionskoeffizienten (28,29) und (abgeschätzten) Molenbrüchen läßt sich aufgrund der UV-Verhältnisse eine Änderung der Zusammensetzung der Oligonucleotidmischung einschätzen. Da sich bei einzelnen Nucleotiden (incl. pI und pX) bestimmte UV-Verhältnisse deutlich von denjenigen der anderen Nucleotide abheben, wird bei Änderung dieser UV-Verhältnisse eine Bestimmung des Molenbruches erleichtert. Bei desaminierter RNA ist eine Reinheitskontrolle von isolierten Oligouridylsäuren mittels der UV-Verhältnisse besonders einfach, da sich die UV-Verhältnisse von pI und pX im Neutralen von den pU-Werten besonders deutlich unterscheiden.

An einem theoretischen Beispiel, U_7X (genauso anwendbar für (U_7,X)), wird die Reinheitskontrolle verdeutlicht: Das UV-Verhältnis 290 nm/260 nm von pU ist 0,02, von X ist 0,61 (28,29). Aus obiger Gleichung wird das entsprechende UV-Verhältnis von U_7X (X-Anteil 12,5%) zu 0,08 errechnet, der X-Anteil ist deutlich zu erkennen. Bei Vorliegen dieser Sequenz als 10%ige Verunreinigung in U_8 (X-Anteil 1,25%) berechnet sich das UV-Verhältnis noch zu 0,03. Mit diesem Wert ist auch die Grenze der Genauigkeit dieser Methode erreicht. Für Verunreinigungen mit Inosin gilt ähnliches: Das UV-Verhältnis 250 nm/260 nm von pU ist 0,74, von pI ist 1,69, eine Beimengung von Inosin wird somit durch eine Erhöhung dieses Verhältnisses indiziert. (UV-aktive Verunreinigungen beeinträchtigen die Berechnung, für die Grenzen und Berechnungsverfahren s. (79).) Als genauere Analysenmethode eignet sich hier die HPLC (s. 3.3 und 3.4).

1.1 Chemische Spaltung

Zur Sequenzierung von RNA werden die Nucleobasen spezifisch chemisch modifiziert und abgespalten. An diesen Fehlstellen läßt sich der Nucleinsäurenstrang unter milden Bedingungen mit Aminen spalten. Diese chemischen Modifizierungen sind ausgelegt für unvollständige Spaltung und werden nur analytisch durchgeführt. Durch Änderung der Reaktionsbedingungen sollen die Purinbasen praktisch vollständig abgespalten werden.

1.1.1 Saure Hydrolyse

Mischungen von Pyrimidinnucleotiden können durch Depurinierung von DNA in präparativen Mengen erhalten werden (30). Mit NaOH in Lösung gebrachte RNA wird analog dieser Vorschrift mit Ameisensäure/Diphenylamin depuriniert und an QAE-Sephadex A-25, gepuffert mit Tris-HCl auf pH 7,5, säulenchromatographisch in die Fraktionen 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M und 1 M NaCl aufgetrennt. Zur weiteren Auftrennung werden die Fraktionen mit Natriumacetat bei pH 3,5 nachgetrennt. Nach der Desaminierung werden diese Peaks bei 55°C in 7 M Harnstoff und pH 7,5 im NaCl-Gradienten nachgereinigt. UV-Verhältnisse wie HPLC an reverser Phase zeigen einen großen Anteil an Verunreinigungen.

Eine weitere Möglichkeit zur Depurinierung ist die G+A-Spaltung nach Maxam und Gilbert (31). RNA wird in Piperidiniumformiatpuffer pH 2 erwärmt. Eine Depurinierung tritt innerhalb 2 h nicht ein. Nach 24 h bei 60°C sind ca. 80% der RNA unspezifisch in kurze Oligomere gespalten.

Diese Spaltungen und analoge Depurinierungen von RNA mit Säuren sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Nur bei der Spaltung mit H_2SO_4 (6. in Tabelle 1) kann aufgrund der UV-Verhältnisse eine teilweise Depurinierung angenommen werden, gleichzeitig wird aber die RNA in Monomere und Oligomere bis zum Tetrameren gespalten. Eine Depurinierung der RNA ist unter diesen Bedingungen nicht möglich.

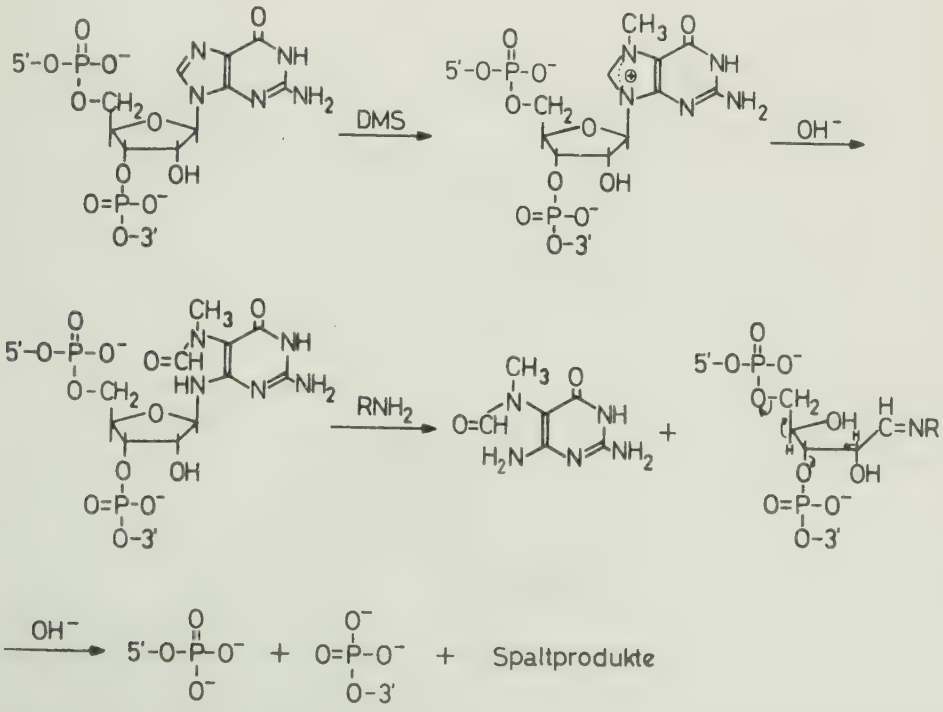
Tabelle 1. Depurinierung von RNA mit Säuren. Die Ansatzgröße bei 2) bis 6) beträgt 200 ml.

	Spaltungsreagenz	RNA-Konz. [g/l]	Puffer	pH	Temperatur [°C]	Spaltungsdauer [h]	Aufarbeitung (Bemerkung)	Ergebnis
1)	HCOOH	100 g RNA in 250ml H_2O mit 10 M NaOH lösen, 18 g Diphenylamin in 500 ml HCOOH zufügen			37	12	mit Diethylether ausschütteln, mit NaOH neutralisieren, ultrafiltrieren, chromatographische Aufarbeitung bei pH 7,5 und pH 3,5	UV-Verhältnisse nicht interpretierbar
2)	HCOOH	10	10% HCOOH	1,5	20	14	neutralisiert und Gelfiltration	Desaminierung von C, keine G-Abnahme
3)	HCOOH	5	0,1 M Piperidiniumformiat	2	30 60 60	2 2 24	neutralisiert und Gelfiltration (nach 2 h keine Spaltung, nach 24 h bei 60°C nur Oligomere bis ca. N_4)	kaum veränderte UV-Verhältnisse
4)	HCl	10	0,1 M HCl	1	95	0,75	neutralisiert und Gelfiltration	Desaminierung von C
5)	HCl	10	2 M Piperidiniumchlorid	1	37	15	neutralisiert und Gelfiltration	UV-Verhältnisse nicht interpretierbar
6)	H_2SO_4	10	1 M H_2SO_4	ca.0	20	24	neutralisiert und ultrafiltriert, chromatographische Aufarbeitung, (nur Oligomere bis ca. Tetrameres)	geringe G-Abnahme geringe C-Zunahme

1.1.2 Methylierung von Guanosin mit Schwefelsäuredimethylester (DMS) und Aminolyse

Bei der guanosinspezifischen Spaltung zur Sequenzierung von DNA und RNA und Untersuchungen zur Desaktivierung von DNA, RNA und t-RNA durch Alkylierung (32-37) wird u.a. DMS als Methylierungsmittel verwendet. DMS methyliert bevorzugt Guanosin an der N-7 Position unter Einführung einer über N-7, C-8 und N-9 delokalisierten positiven Ladung (Schema 1). Durch basischen Angriff wird der Imidazolring zwischen C-8 und N-9 geöffnet, die glykosidische Bindung wird hierdurch instabil und hydrolysiert. Nach Bildung einer Schiffschen Base an der 1'-Position der Ribose wird durch zweimalige β-Eliminierung die ganze Riboseeinheit aus der RNA entfernt.

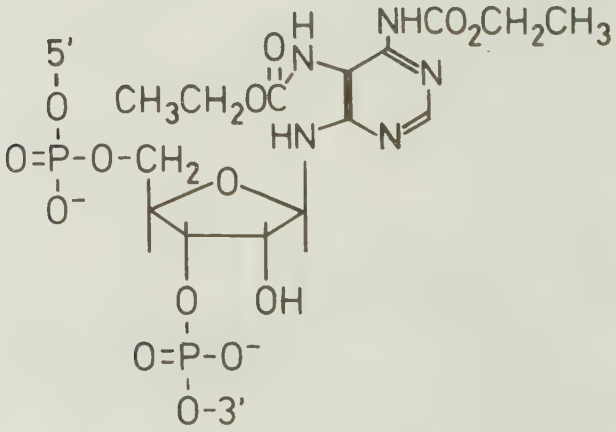
Schema 1:



RNA wird in Phosphatpuffer gelöst und mit DMS versetzt. Nach Ende der Reaktion wird die Lösung ultrafiltriert und mit verschiedenen Basen bei pH 12 bis 12,5 erwärmt. Reaktionsansätze, deren UV-Verhältnisse eine Abnahme des G-Anteils im Polymer zeigen, werden an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7,5 fraktioniert, bei pH 3,5 nachgereinigt und desaminiert. UV-Verhältnisse und HPLC an reverser Phase zeigen nach diesen Reinigungen noch einen hohen Anteil an Nebenprodukten, der nicht mehr abgetrennt werden kann.

1.1.3 Adenosinspaltung mit Diethyldicarbonat (DEP) und Aminolyse

Beim Adenosinabbau zur Sequenzierung von RNA (26,38,39) wird DEP zur Aufspaltung des Imidazolringes (s.u.) und damit einhergehender leichter Hydrolysierbarkeit verwendet (vgl. Schema 1). DEP reagiert in gleicher Weise, aber deutlich langsamer, auch mit Guanosin (40).

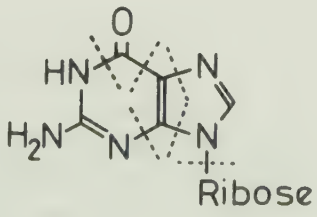


DEP hat in Wasser bei 25°C eine Halbwertszeit von ca. 30 min (41), die Reaktion kann daher 3 h nach der vollständigen Lösung des DEP's abgebrochen werden. Um auch Spuren an DEP zu entfernen *), wird der Reaktionsansatz vor der Aminolyse ultrafiltriert und lyophilisiert. Zur Aminolyse der Basen- und Ribosereste wird das Lyophilisat mit 10%igem NH_3 bzw. Piperidin oder mit 0,2 M Aniliniumacetat-Puffer pH 5,0 versetzt. Anschließend werden Puffer und kleine Spaltprodukte durch Ultrafiltration abgetrennt. Nur nach der Aminolyse mit Piperidin zeigen die UV-Verhältnisse einen gestiegenen C-Anteil in der Oligomerenmischung. Diese Produkte werden an QAE-Sephadex A-25 aufgetrennt. Die UV-Verhältnisse des chromatographisch gereinigten Ansatzes zeigen, daß A nur ungenügend abgespalten wurde.

*) DEP reagiert mit Ammoniak zu carzinogenem Ethylcarbamat

1.2 Methylenblau- und riboflavinsensibilisierte photodynamische Oxidation der Purinbasen

Farbstoffe, die spezifisch mit den Basen der Nucleinsäuren Komplexe bilden, können durch Bestrahlung mit VIS angeregt werden. Sie übertragen die Lichtenergie aus einem angeregten Triplett-Zustand auf die komplexierten Basen, wodurch diese in Anwesenheit von Sauerstoff zerstört werden (42-46). Hierbei entstehen u.a. Harnstoff, Guanidin, CO_2 und Ribose als Oxidationsprodukte. Dies zeigt, daß eine totale Zerstörung des Guanins durch bevorzugte Spaltung einiger Bindungen des Moleküls unter Oxidation von Bruchstücken stattfindet:



Für die oxidative Photolyse von Guanosin und Adenosin eignen sich die Farbstoffe Riboflavin und Methylenblau. RNA und Farbstoff werden in einem 2 l DC-Glastank mit Wasserkühlung bei ca. 20°C bestrahlt. Um eine Oxidation des Uridins zu vermeiden, muß bei pH-Werten unter 8,5 belichtet werden. Zur Ersetzung des verbrauchten Sauerstoffes leitet man mit einer Gaseinleitungsfritte O_2 durch die Flüssigkeit. Nach der Belichtung wird die Lösung konzentriert und entsalzt. Mit Methylenblau erhält man unter drastischen Bedingungen, pH 8,5 und 20 h Belichtung, eine Erhöhung des C-Anteils im Polymer. Eine präparative Depurinierung von RNA ist unter diesen Bedingungen nicht möglich.

1.3 Enzymatische Spaltung der RNA mit Ribonucleasen

Enzyme, die RNA abbauen, werden in zwei Gruppen unterteilt:

- Enzyme, die die Strangenden der RNA angreifen, hierzu gehören die terminale Nucleotide abspaltenden Phosphodiesterasen (Exonucleasen) und die terminale Phosphate abspaltenden Phosphatasen;
- Enzyme, die spezifisch oder unspezifisch die RNA-Kette angreifen (Endonucleasen), hierzu gehören die Ribonucleasen.

Zur enzymatischen Partialhydrolyse von RNA werden Endonucleasen verwendet. Einige Endonucleasen spalten spezifisch nur an bestimmten Basen und werden daher u.a. zur Sequenzierung von RNA verwendet (25,26,47). Zur Purinspaltung eignen sich das guanosinspezifische Enzym RNase T_1 (48,49) und die purinspezifische RNase U_2 (50,51).

Die Phosphodiesterasen sind für Partialhydrolysen von RNA ungeeignet, da sie nicht basenspezifisch die RNA Nucleotid für Nucleotid vollständig abbauen.

1.3.1 RNA-Partialhydrolyse an Guanosinmonomereinheiten unter Bildung von $(A/C/U)_nGp$-Oligomeren und Gp

Eine 0,6%ige RNA-Lösung in Tris-HCl Puffer pH 7,5 wird unter EDTA-Zusatz mit RNase T_1 20 h gespalten. Die Partialhydrolysate werden gelchromatographisch an Sephadex G-15 aufgetrennt (Fig. 1). Peak III wird papierchromatographisch in System A mit Referenzsubstanz pG und durch Bestimmung der UV-Verhältnisse als Gp identifiziert, Peak II als Dimeres N-Gp und Peak I als ein Gemisch von Oligomeren mit drei und mehr Monomereinheiten. Durch Bestimmung der A_{260}-Einheiten der Peaks läßt sich die Bildung von Gp zu ca. 17% und von N-Gp zu ca. 35% ermitteln, wobei die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten bei 260 nm nicht berücksichtigt werden. Die UV-Verhältnisse von Peak I zeigen eine deutliche G-Abnahme aber praktisch keine C-Zunahme. Diese Spaltung läßt sich in präparativem Maßstab durchführen.

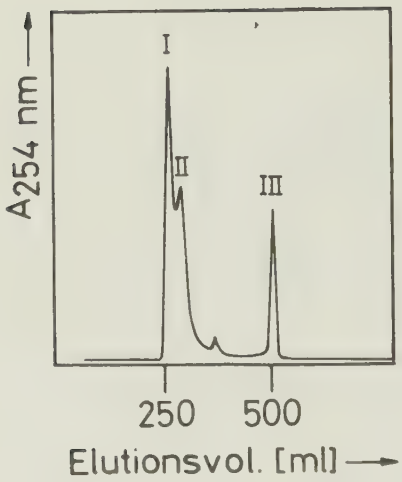


Fig. 1. Elutionsprofil der gelchromatographischen Trennung von RNase T_1-gespaltener RNA an Sephadex G-15 (80 x 4 cm). Die Elution erfolgt mit Wasser bei Raumtemperatur. Der Durchfluß beträgt 600 ml/h. Peak I enthält Oligomere mit drei und mehr Monomereinheiten, Peak II Dimere und Peak III Gp.

1.3.2 RNA-Partialhydrolyse an Adenosin- und Guanosinmonomereinheiten unter Bildung von $(C/U)_n(A/G)p$-Oligomeren und Ap, Gp

Eine 0,5%ige RNA-Lösung in Natriumacetat-Puffer pH 4,5 wird unter EDTA-Zusatz mit RNase U_2 gespalten. Nach einem Tag wird das Partialhydrolysat an Sephadex G-15 gelchromatographisch aufgetrennt (vgl. Fig. 1). Die Monomeren (Peak III) lassen sich durch Bestimmung der UV-Verhältnisse als eine ca. 1:1 Mischung von Ap und Gp identifizieren. Diese Spaltung ist präparativ durchführbar.

1.4 Terminale Spaltungen an RNA und Oligoribonucleotiden

1.4.1 Alkalische Phosphatase (52)

Alkalische Phosphatase stellt nur geringe Anforderungen an Substratkonzentration, Puffer, Temperatur und pH (47,53). Zur Dephosphorylierung von Oligonucleotiden ist 0,05 bis 0,2 M Tris-HCl Puffer pH 8-9 und eine Substratkonzentration bis zu 250 mg RNA/ml

Puffer einsetzbar. Die Temperatur wird auf 37°C eingestellt. Das Reaktionsende wird mit HPLC an Partisil-10 SAX (Anionenaustauscher) ermittelt. Für Reaktionszeiten von ca. 1 h sind 16,7 nkat (≙ 1 U) Phosphatase je mg Oligonucleotid ausreichend. Die Spaltung ist präparativ durchführbar.

1.4.2 Oxidation der 3'-terminalen Riboseeinheit mit IO_4^- und Eliminierung nach Bildung einer Schiffschen Base

Die cis-ständigen Hydroxylgruppen einer 3'-terminalen Ribose lassen sich mit Perjodat unter Spaltung der C-C Bindung zu Aldehyden oxidieren (54). Die Aldehyde reagieren mit Aminen zu Schiffschen Basen. Hierdurch wird unter milden Bedingungen eine Eliminierung des 5'-Phosphates wie auch eine Hydrolyse der Nucleobase möglich (55-62). Die Basen Cyclohexylamin, Piperidin, Anilin, Lysin und Glycin werden in verschiedenen Konzentrationen und bei unterschiedlichen pH-Werten auf ihre Eignung zur Eliminierung im präparativen Maßstab getestet (Tabelle 2). Die Reaktionskinetik wird mit HPLC an Partisil-10 SAX verfolgt (vgl. Fig. 7 und 8). Als Substrat wird HPLC-reines A-G verwendet. Nur mit 1 M Lysin-HCl pH 8,1 erhält man eine quantitative Spaltung zu Ap. Die Spaltung ist präparativ durchführbar.

Da die letzten beiden Spaltungen nur einen Teil der sich stetig wiederholenden Ribose-Phosphat-Einheit abspalten, kann auf diese Weise die RNA vom 3'-Ende her um einen beliebigen Teil gekürzt werden. Die Kombination dieser Spaltungen wird verwendet zur Sequenzermittlung des 3'-Endes von RNA (63).

Tabelle 2: Bedingungen der basischen Abspaltung von G aus A-G nach der Oxidation mit IO_4^-. Ansatz: 0,1 mg A-G in 0,1 ml Puffer. Die Oxidation der 3'-terminalen Ribose (Schema 2) erfolgt mit 0,025 bis 0,2 M IO_4^-. Der Reaktionsverlauf wird durch die Basenkomponente des Puffers beeinflußt.

Puffer	Spaltbedingungen		
	pH	Temperatur [°C]	Zeit [h]
1 M Cyclohexylamin	11,9	20	2
1 M Cyclohexylammoniumacetat	6,2	20	2
1 M Cyclohexylammoniumacetat	8,2	45	1,5
1 M Piperidiniumacetat	8,2	45	1,5
0,33 M Aniliniumchlorid + 0,1 M Natriumacetat	5,0	25	3
1 M Lysin-HCl	8,1	45	1,5
0,1 M Glycin-NaOH	10,3	20	24

2 Darstellung von U_n durch Partialhydrolyse von RNA und chromatographische Isolierung der Fragmente

Durch Kombination der zu präparativen Arbeiten geeigneten Reaktionen lassen sich Oligouridylsäuren aus RNA gewinnen. Da Cytidin durch Desaminierung in Uridin umgewandelt wird, braucht die Partialhydrolyse der RNA nur auf Depurinierung ausgelegt werden. Die einzelnen Schritte hierzu werden an Hand einer hypothetischen RNA-Sequenz erklärt und sind in Schema 3 analog der präparativen Durchführung zusammengefaßt.

RNA-Sequenz vor der enzymatischen Spaltung:

A-C-C-U-A-A-C-U-G-G-G-U-A-I-U-C-U-U-C-A-U-G-A-G-C-U-A-A-A-G-Gp

Diese Sequenz wird als erstes mit RNase T_1 gespalten. RNase T_1 spaltet in RNA bevorzugt 3'-Guanylsäure von 5'-Hydroxylgruppen benachbarter Nucleotide (...Gp/N...), wobei 3'-terminales Guanosinphosphat entsteht. Das Enzym "erkennt" seine zu spaltenden Nucleotide an unsubstituierten 1-N-, 7-N- und O^6-Positionen (48). Neben Guanosin wird auch an Nucleotiden mit seltenen Basen wie Hypoxanthin, Xanthin, 2-Methylhypoxanthin, N^2-Methylguanin usw. gespalten. Die Spaltungsgeschwindigkeit an Nucleotiden mit seltenen Basen ist i.a. langsamer als die nach Guanosin (64). Die so erhaltenen Hydrolysate enthalten keine G bzw. I Bausteine mehr im Inneren ihrer Sequenzen.

RNA-Sequenzen nach Behandlung mit RNase T_1:

A-C-C-U-A-A-C-U-Gp, Gp, Gp, U-A-Ip, U-C-U-U-C-A-U-Gp, A-Gp, C-U-A-A-A-Gp, Gp.

Durch Ultrafiltration und Ionenaustauschchromatographie an QAE-Sephadex A-25 werden die Monomeren und Dimeren entfernt:

A-C-C-U-A-A-C-U-Gp, U-A-Ip, U-C-U-U-C-A-U-Gp, C-U-A-A-A-Gp.

Die nächste Spaltung erfolgt mit RNase U_2. Dieses Enzym greift spezifisch Purinnucleotide an und spaltet ebenso wie RNase T_1 die 3'-benachbarte Phosphodiesterbindung ...Rp/N... . Bestimmte seltene Basen werden, wenn auch teilweise sehr langsam, ebenso gespalten (51). Aus dieser Spaltung resultieren Oligopyrimidinnucleotide mit 3'-terminalem Purinnucleosidphosphat und monomere Purinnucleotide.

RNA-Sequenz nach Behandlung mit RNase U_2:

Ap, C-C-U-Ap, Ap, C-U-Gp, U-Ap, Ip, U-C-U-U-C-Ap, U-Gp, C-U-Ap, Ap, Ap, Gp.

Durch Ultrafiltration werden wieder die Monomeren und Dimeren entfernt:

C-C-U-Ap, C-U-Gp, U-C-U-U-C-Ap, C-U-Ap.

Diese Oligomeren werden nun desaminiert (65), wobei C in U, A in I und G in X überführt wird:

U-U-U-Ip, U-U-Xp, U-U-U-U-U-Ip, U-U-Ip.

Durch Ionenaustauschchromatographie an QAE-Sephadex A-25 werden die Oligomeren nach zunehmender Ladung ($\hat{=}$ Kettenlänge) getrennt. Hierbei können bei der Ultrafiltration eventuell nicht abgetrennte Dimere verworfen werden. Anschließend werden die Produkte dephosphoryliert und chromatographiert:

U-U-X/U-U-I, U-U-U-I, U-U-U-U-U-I.

Die dephosphorylierten Produkte werden durch Ionenaustauschchromatographie an QAE-Sephadex A-25 gereinigt. Als nächstes werden durch Oxidation mit IO_4^- in Lysin-HCl Puffer die 3'-terminalen Purinnucleoside entfernt (s. Schema 2). IO_4^- oxidiert die cisständigen Hydroxylfunktionen der Ribose zu Aldehyden. Diese Aldehyde reagieren mit Lysin zu Schiffschen Basen, hierdurch wird die Phosphodiesterspaltung durch β-Eliminierung des 4'-H möglich. In

einem sekundären Schritt wird die Base hydrolysiert. Durch Hydrolyse des vermutlich als Zwischenprodukt entstehenden Halbacetals (zweite eckige Klammer in Schema 2) entstehen weitere Oxogruppen, die unter den Bedingungen weiter zu konjugierten Schiffschen Basen reagieren. Die Produkte werden wieder chromatographisch an QAE-Sephadex A-25 gereinigt:

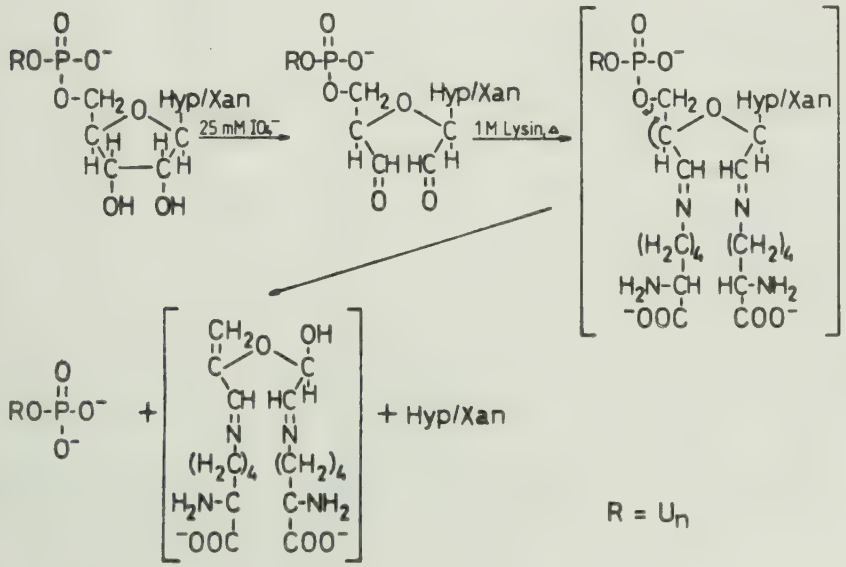
U-Up, U-U-Up, U-U-U-U-Up.

Diese Uridylsäuren werden erneut dephosphoryliert und gereinigt:

U-U, U-U-U, U-U-U-U-U.

Unter den bei diesen Partialhydrolysen auftretenden Bedingungen werden seltene Basen wie Dihydrouracil, Pseudouracil und 7-Methylpurine auch hydrolysiert (16).

Schema 2:

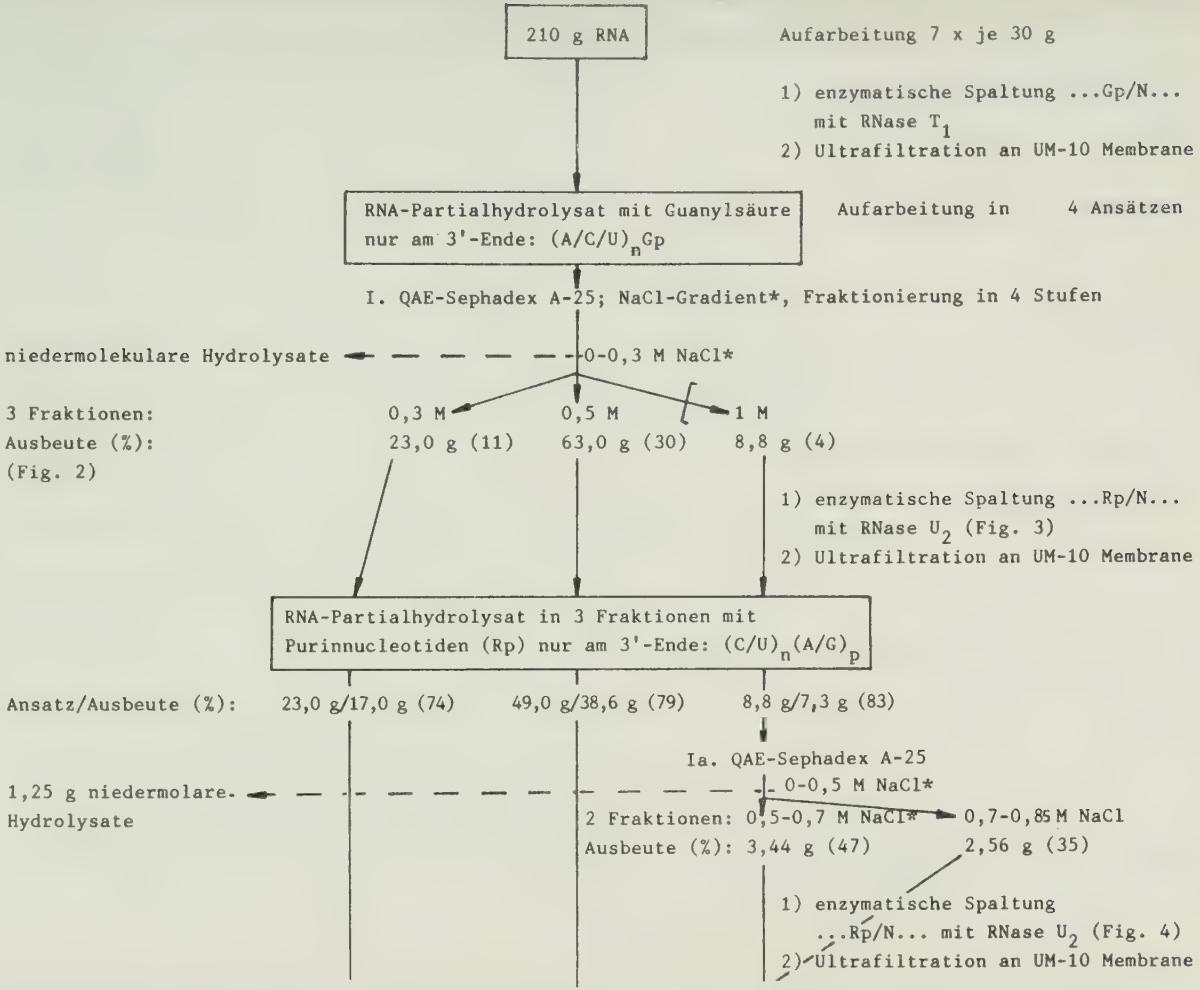


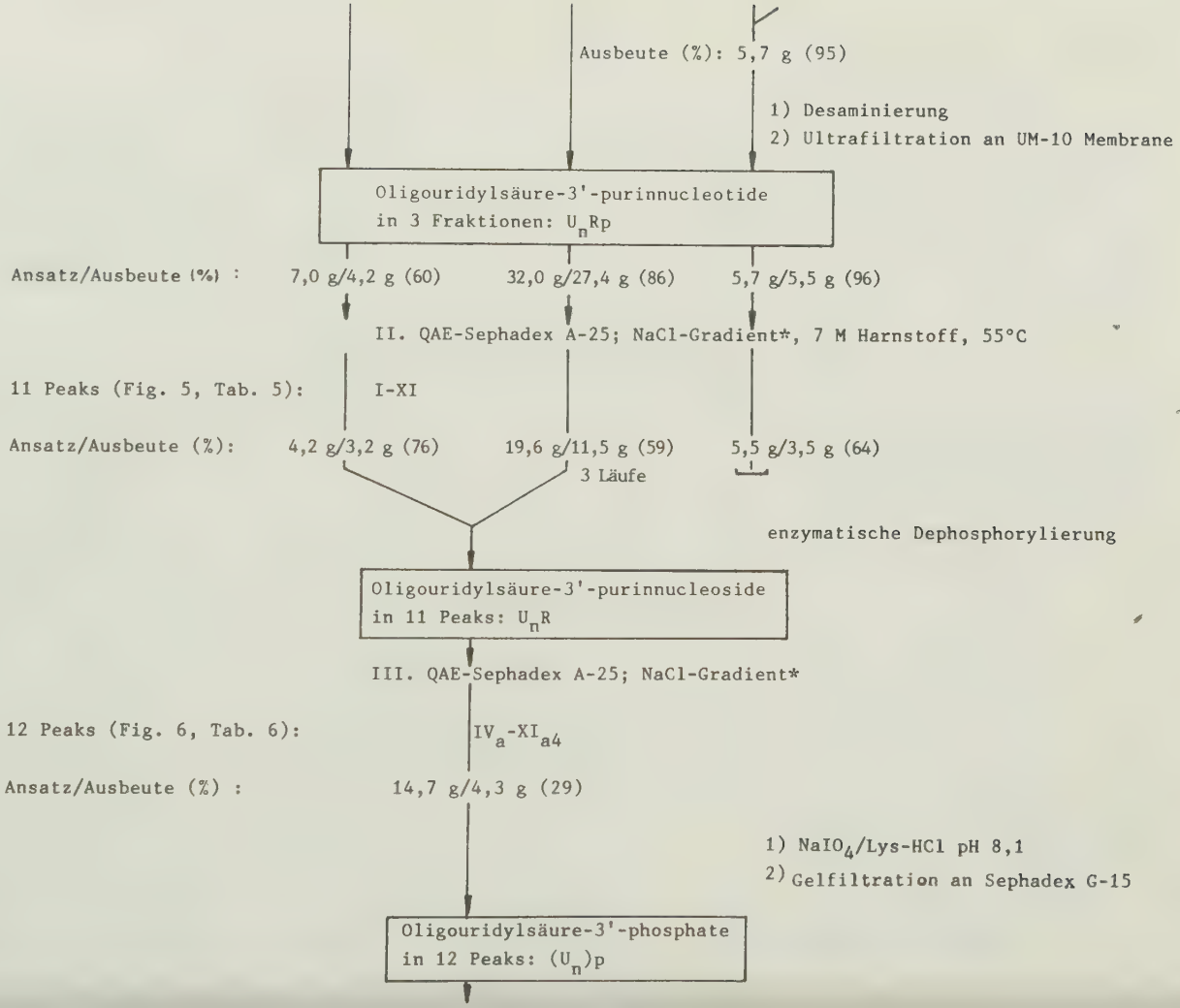
3 Präparative Durchführung der Darstellung von U_n aus RNA

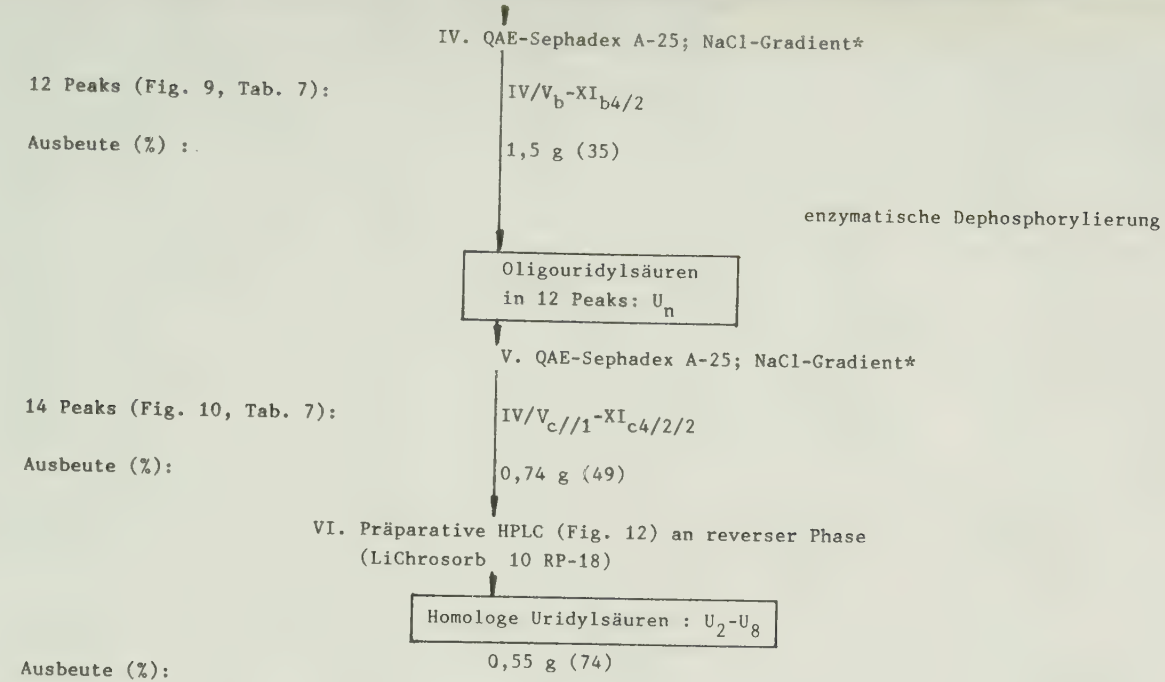
Die Darstellung von U_n nach 2 wird in vier Teile untergliedert. Im ersten Teil wird die RNA enzymatisch zu Oligopyrimidinnucleotid-3'-purinnucleotiden partialhydrolysiert. Die Abspaltung des 3'-terminalen Purinnucleotides durch enzymatische und chemische Methoden wird in Teil 2 beschrieben. Im dritten und vierten Teil werden die erhaltenen Oligouridylsäuren mit HPLC untersucht, präparativ nachgereinigt und die Zusammensetzung durch enzymatischen Abbau bestimmt. Die einzelnen Schritte sind in Schema 3 zusammengefaßt.

3.1 Darstellung und Isolierung von Oligouridylsäure-3'-purinnucleotiden (U_nRp)

Der erste Schritt zur Darstellung von U_nRp ist die enzymatische RNA-Spaltung mit RNase T_1 (siehe Schema 3), hierdurch erhält man Oligonucleotide, die Guanylsäure nur am 3'-Ende ihrer Sequenz enthalten. Die Spaltung wird analog 1.3.1 mit 0,6%iger RNA-Lösung bei pH 7,5 durchgeführt. Die Ansatzgröße beträgt 5 l, die Spalttemperatur ist 37°C. Täglich wird dem Reaktionsansatz eine Probe entnommen und gelchromatographisch an Sephadex G-15 das Reaktionsende bestimmt: Sobald sich das Elutionsprofil (Fig. 1) nicht mehr verändert (ca. 3. Tag), wird die Spaltung abgebrochen. Monomere und dimere Spaltungsprodukte werden durch Konzentrierung des Reaktionsansatzes an einer Ultrafiltrationsmembrane und weiter durch Ionenaustauschchromatographie an QAE-Sephadex A-25 mit Gradientenelution von 0 nach 0,3 M NaCl bei pH 7,5 entfernt (s. Fig. 2 und Schritt I. in Schema 3). Einzelne der hierbei erhaltenen Peaks lassen sich aufgrund ihrer UV-Verhältnisse bei pH 7 und pH 2 als Ap, Gp, U-Gp identifizieren. Höhergeladene Hydrolysate werden anschließend aus drei Fraktionsbereichen isoliert. Die erste Fraktion, die mit 0,3 M NaCl eluiert wird, enthält nur Dimere und Trimere. Die zweite Fraktion, eluiert mit 0,5 M NaCl enthält Oligomere bis zum Nonameren, die dritte, 1 M Fraktion enthält höhermolekulare RNA-Fragmente mit einem höheren Anteil an Verun-


210 g RNA
Aufarbeitung 7 x je 30 g
1) enzymatische Spaltung ...Gp/N... mit RNase T_1
2) Ultrafiltration an UM-10 Membrane
RNA-Partialhydrolysat mit Guanylsäure nur am 3'-Ende: $(A/C/U)_nGp$
Aufarbeitung in 4 Ansätzen
I. QAE-Sephadex A-25; NaCl-Gradient*, Fraktionierung in 4 Stufen
niedermolekulare Hydrolysate
0-0,3 M NaCl*
3 Fraktionen:
Ausbeute (%):
(Fig. 2)
0,3 M
0,5 M
1 M
23,0 g (11)
63,0 g (30)
8,8 g (4)
1) enzymatische Spaltung ...Rp/N... mit RNase U_2 (Fig. 3)
2) Ultrafiltration an UM-10 Membrane
RNA-Partialhydrolysat in 3 Fraktionen mit Purinnucleotiden (Rp) nur am 3'-Ende: $(C/U)_n(A/G)_p$
Ansatz/Ausbeute (%):
23,0 g/17,0 g (74)
49,0 g/38,6 g (79)
8,8 g/7,3 g (83)
Ia. QAE-Sephadex A-25
1,25 g niedermolare Hydrolysate
0-0,5 M NaCl*
2 Fraktionen: 0,5-0,7 M NaCl*
0,7-0,85 M NaCl
Ausbeute (%): 3,44 g (47)
2,56 g (35)
1) enzymatische Spaltung ...Rp/N... mit RNase U_2 (Fig. 4)
2) Ultrafiltration an UM-10 Membrane


Ausbeute (%): 5,7 g (95)
1) Desaminierung
2) Ultrafiltration an UM-10 Membrane
Oligouridylsäure-3'-purinnucleotide
in 3 Fraktionen: U_nRp
Ansatz/Ausbeute (%) :
7,0 g/4,2 g (60)
32,0 g/27,4 g (86)
5,7 g/5,5 g (96)
II. QAE-Sephadex A-25; NaCl-Gradient*, 7 M Harnstoff, 55°C
11 Peaks (Fig. 5, Tab. 5):
I-XI
Ansatz/Ausbeute (%):
4,2 g/3,2 g (76)
19,6 g/11,5 g (59)
5,5 g/3,5 g (64)
3 Läufe
enzymatische Dephosphorylierung
Oligouridylsäure-3'-purinnucleoside
in 11 Peaks: U_nR
III. QAE-Sephadex A-25; NaCl-Gradient*
12 Peaks (Fig. 6, Tab. 6):
IV_a-XI_{a4}
Ansatz/Ausbeute (%) :
14,7 g/4,3 g (29)
1) $NaIO_4$/Lys-HCl pH 8,1
2) Gelfiltration an Sephadex G-15
Oligouridylsäure-3'-phosphate
in 12 Peaks: $(U_n)p$



* mit 25 mM Tris-HCl auf pH 7,5 gepuffert

Schema 3. Darstellung von U_n durch Partialhydrolyse von RNA und chromatographische Trennung. Bestimmte Nucleoside mit seltenen Basen (s. 2 Darstellung von U_n) werden auch hydrolysiert. Die 1 M Fraktion ist in Klammern gesetzt, da sie deutlich mehr Nebenprodukte enthält (vgl. Fig. 5), die sich nicht mehr abtennen lassen.

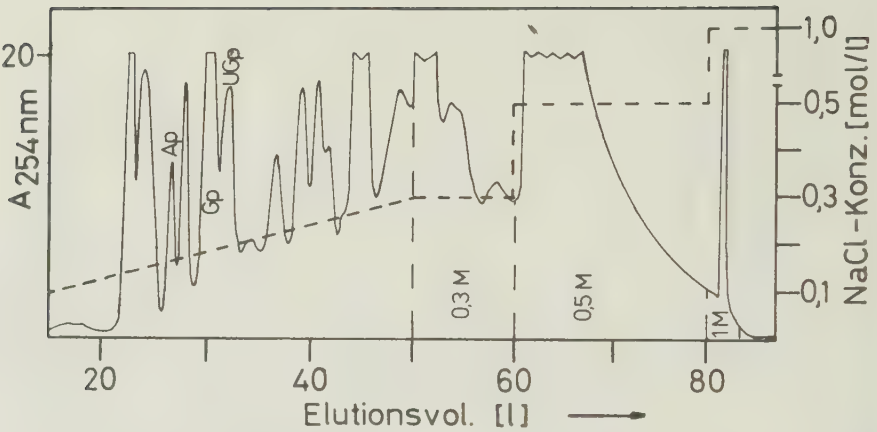


Fig. 2. Automatisch registriertes Elutionsprofil der säulenchromatographischen Trennung von 60 g RNase T_1-gespaltener RNA an QAE-Sephadex A-25 (75 x 8 cm). Vor der chromatographischen Auftrennung wird ein Teil der niedermolekularen Spaltprodukte durch Ultrafiltration entfernt. Die Elution erfolgt bei Raumtemperatur mit einem Durchfluß von 1,5 l/h im steigenden NaCl-Gradienten, der mit 25 mM Tris-HCl auf pH 7,5 gepuffert ist. Die Fraktionen werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und mit RNase U_2 weitergespalten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 und im Allgemeinen Teil 3.1 zusammengefaßt.

reinigungen. Die Fraktionen werden durch Ultrafiltration entsalzt und anschließend lyophilisiert. Eine Auftrennung der Fraktionen bei pH 3,5 an QAE-Sephadex A-25 in cytidinreiche Oligonucleotide (30,66) gelingt nicht. Dies steht in Einklang mit anderen Untersuchungen, die nur einen geringen Anteil an Cytidylsäure in RNA finden (23,67). Während die 1 M Fraktion nur ca. 4% des Partialhydrolysates ausmacht, werden mit der 0,5 M Fraktion ca. 30% eluiert und mit der 0,3 M Fraktion ca. 11%. Aus 30 g RNA erhält man so ca. 3,3 g einer nieder-, 9,0 g einer mittel- und 1,2 g einer höhermolekularen Oligonucleotidmischung, die ein Guanosinphosphat nur am 3'-Ende enthält. In Tabelle 3 sind die UV-Verhältnisse der Fraktionen zusammengefaßt. Das erniedrigte 250nm/260nm-Verhältnis bei pH 7 gegenüber der Ausgangs-RNA zeigt eine Abnahme des Guanosinanteils in den RNA-Fragmenten. Eine

ansich ebenso zu erwartende Zunahme des Cytidinanteils (höhere Differenz zwischen pH 7 und pH 2 der anderen Werte) kann nicht eindeutig festgestellt werden.

Tabelle 3: UV-Verhältnisse der eingesetzten RNA sowie der 0,3 M-, 0,5 M- und 1 M Fraktion der chromatographischen Auftrennung an QAE-Sephadex A-25 der RNase T_1-Spaltung.

	UV-Verhältnisse (pH 7)			UV-Verhältnisse (pH 2)		
	250 nm / 260 nm	280 nm / 260 nm	290 nm / 260 nm	250 nm / 260 nm	280 nm / 260 nm	290 nm / 260 nm
RNA	0,93	0,50	0,19	0,80	0,64	0,38
0,3 M Fraktion	0,90	0,47	0,17	0,80	0,61	0,35
0,5 M Fraktion	0,88	0,47	0,17	0,80	0,58	0,33
1 M Fraktion	0,88	0,46	0,18	0,79	0,60	0,39

Die Fraktionen werden in 0,5%iger Lösung in Natriumacetatpuffer bei pH 4,5 mit RNase U_2 weitergespalten. Dieses Enzym spaltet die Oligomeren nach jeder Adenylsäureeinheit. RNasen sind sehr stabile Enzyme, deshalb kann mit wenig Enzym, dafür über mehrere Tage gespalten werden. Das Reaktionsende wird wieder gelchromatographisch bestimmt. Da die 1 M Fraktion deutlich langsamer und weniger spaltet als die anderen Fraktionen (Fig. 3), wird sie, um eventuell vorhandene Inhibitoren zu entfernen, an QAE-Sephadex A-25 im NaCl-Gradienten in drei Fraktionsbereiche (Schritt Ia in Schema 3) nachgetrennt: 0,4 bis 0,5 M NaCl, 0,7 M NaCl und 0,85 M NaCl. Diese Fraktionen werden entsalzt und erneut, mit der doppelten Menge, mit RNase U_2 nachgespalten. Hierbei wird keine Zunahme der Dimeren und keine Bildung von Monomeren festgestellt (Fig. 4), so daß keine weitere Spaltung der RNA-Fragmente stattgefunden haben kann. Da die 0,4 bis 0,5 M NaCl Fraktion nur kurze Oligomere enthält, wird sie verworfen.

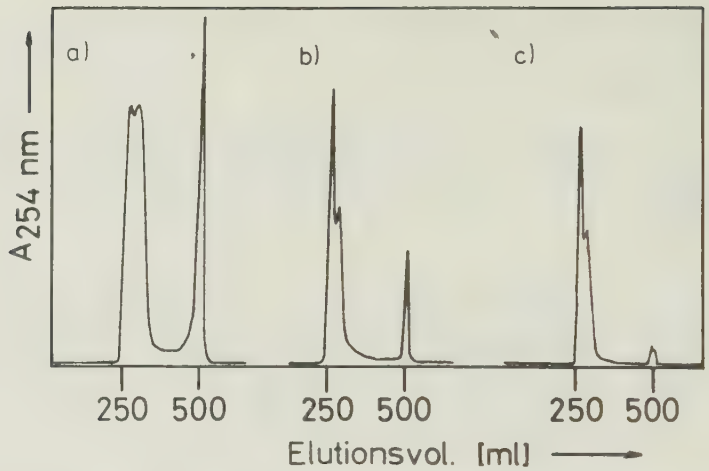


Fig. 3. Elutionsprofile der mit RNase U_2 gespaltenen Fraktionen aus Fig. 2. an einer Sephadex G-15 Säule (80 x 4 cm). Die Elution erfolgt mit Wasser bei Raumtemperatur, Durchfluß 600 ml/h. a) 0,3 M Fraktion nach 4 Tagen Spaltung; b) 0,5 M Fraktion nach 6 Tagen Spaltung; c) 1 M Fraktion nach 8 Tagen Spaltung.

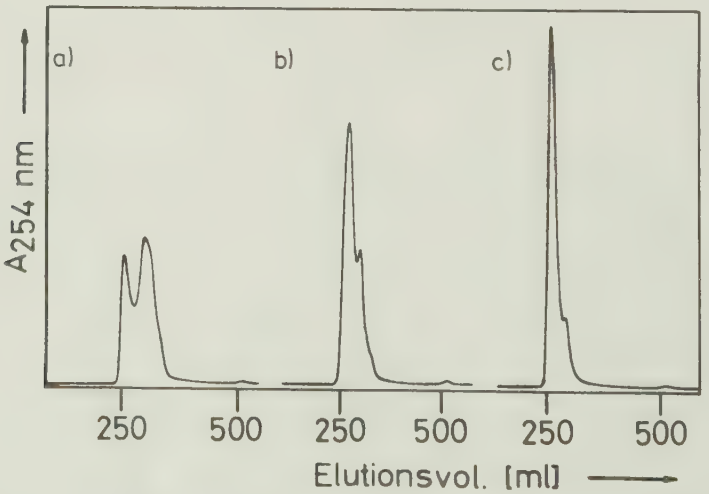


Fig. 4. Elutionsprofile der zweiten RNase U_2-Spaltung der 1 M Fraktion aus Fig. 2. Chromatographische Bedingungen siehe Fig. 3. Die 1 M Fraktion wird nach der ersten RNase U_2-Spaltung an QAE-Sephadex A-25 im NaCl-Gradienten in drei Fraktionsbereiche unterteilt: a) 0,4 bis 0,5 M NaCl; b) 0,5 bis 0,7 M NaCl; c) 0,7 bis 0,85 M NaCl. Diese Fraktionen werden entsalzt und mit RNase U_2 nochmals inkubiert.

Nach Beendigung der Spaltungen werden die entstandenen Monomeren Ap und Gp sowie ein Teil der Dimeren Y-Rp durch Ultrafiltration entfernt. Der Gewichtsverlust beträgt bei der 0,3 M Fraktion 26%, bei der 0,5 M Fraktion 22% und bei der zweimal RNase U_2-gespaltenen 1 M Fraktion 35% (Gewichtsverlust nach der ersten RNase U_2-Spaltung: 17%). Aus den UV-Verhältnissen der Tabelle 4 folgt, daß nur bei der 0,3- und 0,5 M Fraktion die G- und A-Anteile ab- bzw. der C-Anteil zunimmt. Die UV-Verhältnisse der 1 M Fraktion sind kaum verändert.

Tabelle 4: UV-Verhältnisse der RNA-Fragmente, a) nach den RNase U_2-Spaltungen der 0,3 M-, 0,5 M- und 1 M Fraktion der RNase T_1-Spaltung; b) nach der Desaminierung.

a)	UV-Verhältnisse (pH 7)			UV-Verhältnisse (pH 2)		
	250 nm / 260 nm	280 nm / 260 nm	290 nm / 260 nm	250 nm / 260 nm	280 nm / 260 nm	290 nm / 260 nm
RNA	0,93	0,50	0,19	0,80	0,64	0,38
0,3 M Fraktion	0,88	0,55	0,24	0,78	0,74	0,44
0,5 M Fraktion	0,85	0,55	0,25	0,76	0,78	0,46
1 M Fraktion	0,88	0,49	0,20	0,80	0,66	0,40
b) desaminiert						
pU	0,76	0,36	0,04	0,75	0,35	0,04
0,3 M Fraktion	0,97	0,43	0,12	0,89	0,33	0,08
0,5 M Fraktion	0,98	0,40	0,10	0,93	0,35	0,08
1 M Fraktion	0,92	0,42	0,14	0,90	0,39	0,12

Die so erhaltenen Oligopyrimidinnucleotid-3'-purinnucleosidphosphate werden mit einem großen Überschuß an $NaNO_2$ in 16,5%iger Essigsäure (Vol. %), pH 3,35, ca. zwei Tage desaminiert (65). Der Reaktionsansatz wird mit Natronlauge unter Kühlung neutralisiert und durch Ultrafiltration entsalzt. Die UV-Verhältnisse der desaminierten Fraktionen sind ebenfalls in Tabelle 4 zusammengefaßt. Die entstandene Mischung von Oligouridylsäure-3'-purinnucleosidphosphaten wird bei pH 7,5 an QAE-Sephadex A-25 im linear steigenden NaCl-Gradienten unter Zusatz von 7M Harnstoff bei 55°C aufgetrennt (Schritt II. in Schema 3). Die Elutionsprofile (Fig. 5) aller drei Fraktionen sind nur im niedermolaren Salzbereich gut aufgelöst. Bei höhermolarem Salz können nur Peakbereiche abgetrennt werden. Die innerhalb der senkrechten Strichelung zusammengefaßten Peaks werden zur Entfernung des Harnstoffes auf das 2,5-fache Volumen verdünnt. Im Batchverfahren mit QAE-Sephadex A-25 werden die Oligonucleotide gebunden und mit 1M NaCl wieder abgetrennt, ultrafiltriert und anschließend lyophilisiert. Die Ergebnisse dieses Trennschrittes sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Die UV-Verhältnisse der Peaks entsprechen denen in Tabelle 4.

Tabelle 5. Isolierte Menge der einzelnen Peaks aus Fig. 5 in g. Gleiche Peaks der 0,3 M- und 0,5 M Fraktion werden vereinigt.

	Peak I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
0,3 M Fraktion	0,32	0,55	0,32	0,30	0,35	0,66	0,69	--	--	--	--
0,5 M Fraktion	* 0,91	1,48	--	2,01	--	1,21	1,08	0,47	0,66	1,16	2,54
1 M Fraktion	--	1,07	--	0,25	--	0,44	0,42	0,33	0,28	0,74	--

*) Summe aus drei Läufen

HPLC Untersuchungen der Peaks mit Partisil-10 SAX (Anionenaustauscher) und an Nucleosil $7C_{18}$ zeigen, daß die Produkte noch einen hohen Anteil an Verunreinigungen aufweisen. Da die Peaks der 1M Fraktion so stark verunreinigt sind, daß sich hier mit Nucleosil $7C_{18}$, auch nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase, kein Hauptprodukt identifizieren läßt, werden diese Peaks nicht weiter aufgearbeitet.

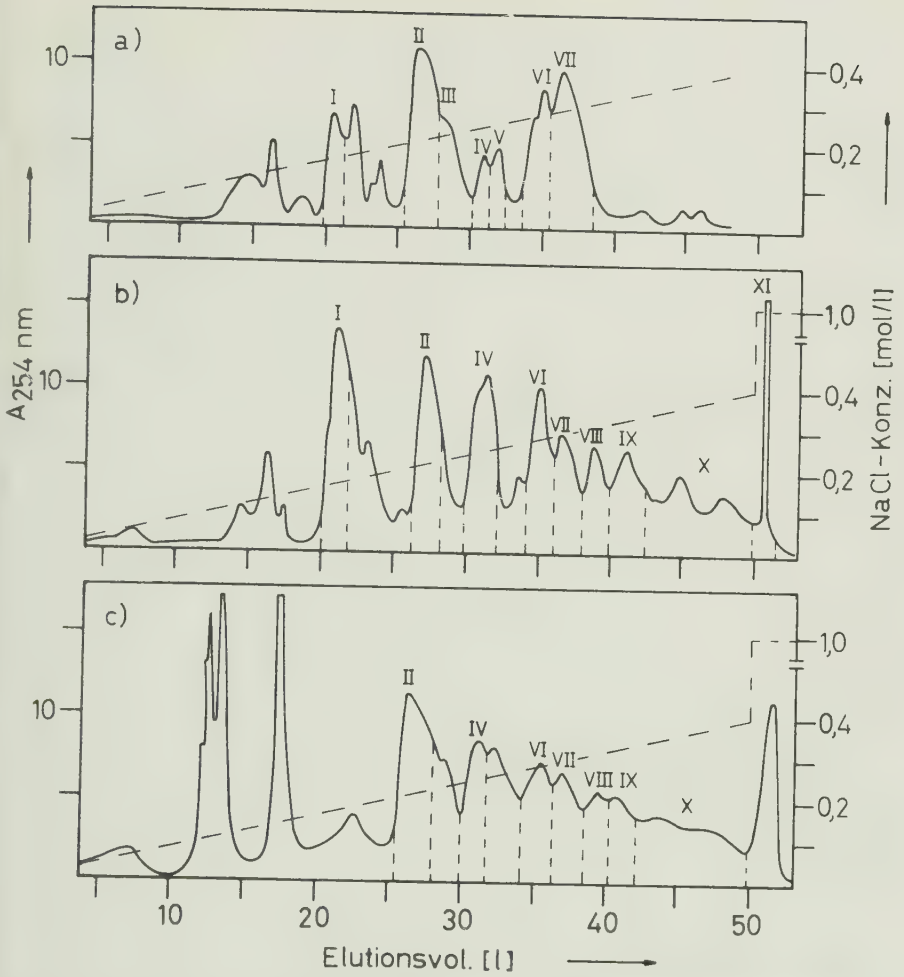


Fig. 5. Automatisch registrierte Elutionsprofile der säulenchromatographischen Trennung an QAE-Sephadex A-25 (70 x 3 cm) der RNase U_2-gespaltenen und desaminierten Fraktionen aus Fig. 4. a) 0,3 M Fraktion, b) 0,5 M Fraktion und c) 1 M Fraktion. Auftrag: a) 4,2 g, b) 6,6 g und c) 5,5 g. Die Elution erfolgt bei 55°C im linear steigenden NaCl-Gradienten, der mit 25 mM Tris-HCl auf pH 7,5 gepuffert und mit 7 M Harnstoff versetzt ist; Durchfluß 300 ml/h. Fraktionen mit pU-nahen UV-Verhältnissen werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und lyophilisiert. Peaks aus verschiedenen Läufen, die bei der Anionenaustausch-HPLC gleiche Retentionszeiten aufweisen, werden aus a) und b) vereinigt. Die Peaks aus c) sind so stark verunreinigt, daß sie sich auch mit Reversed-Phase HPLC nicht auftrennen lassen.

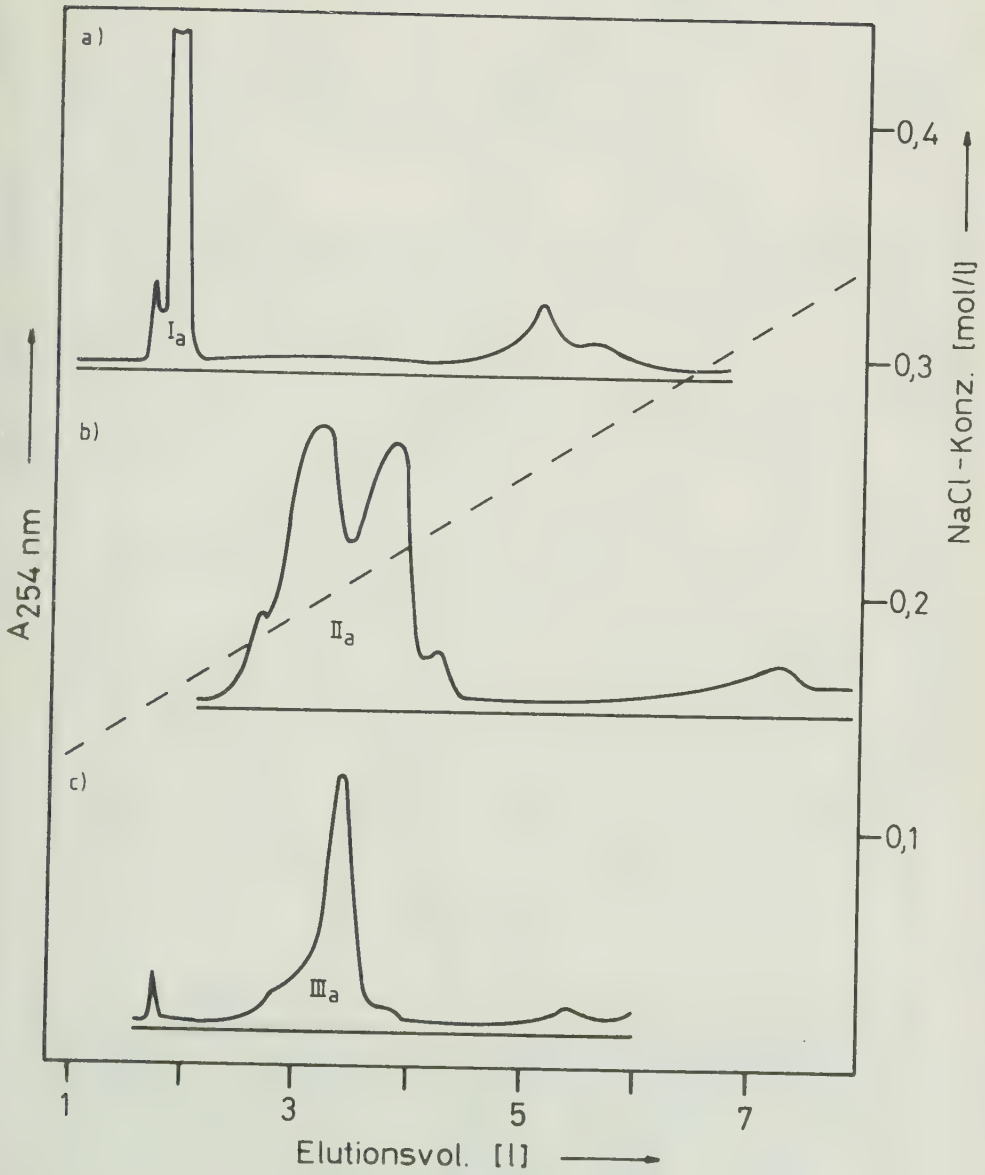
3.2 Darstellung von Oligouridylsäuren aus U_nRp

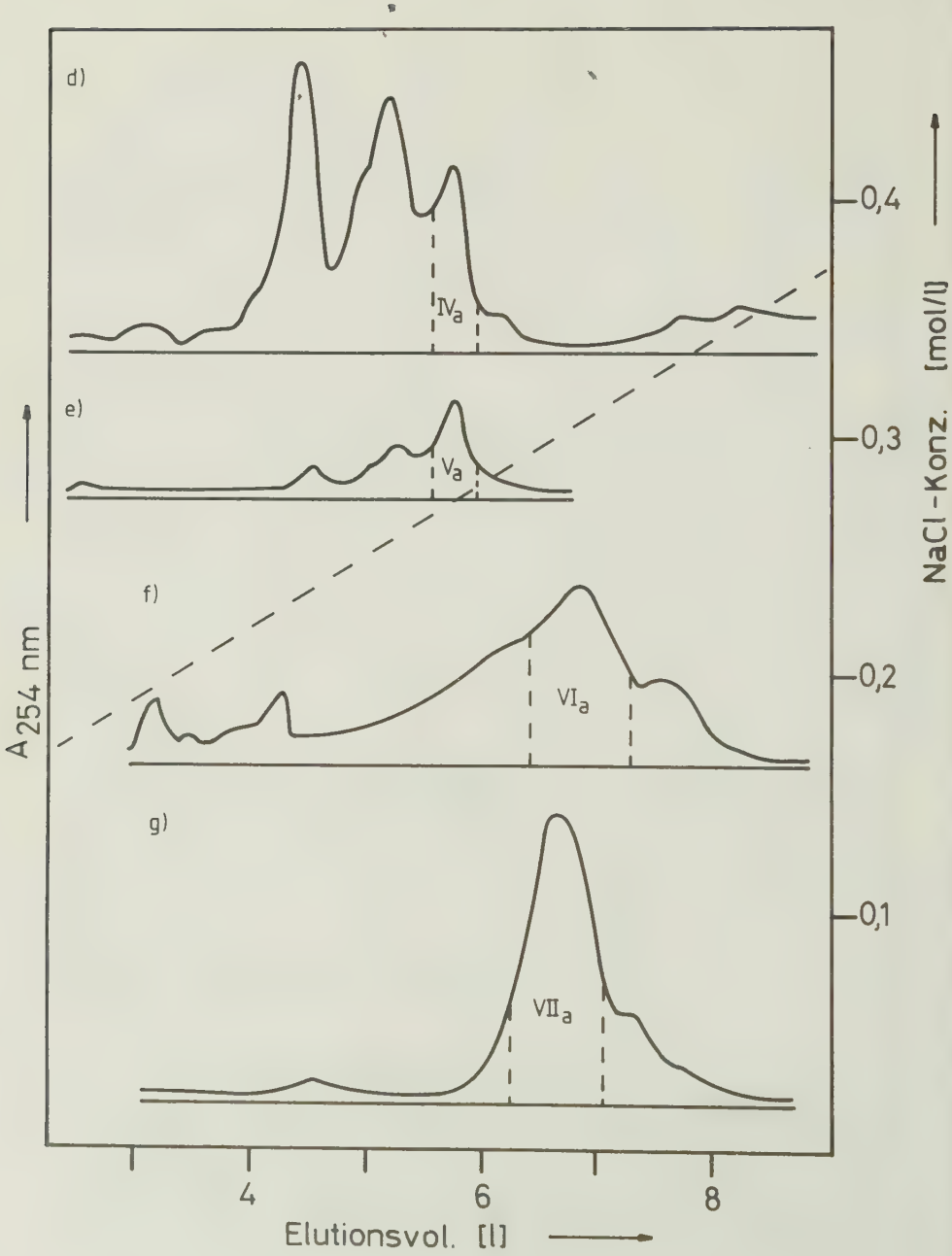
Die desaminierten und chromatographisch aufgetrennten Fragmente aus dem RNase U_2-Hydrolysat werden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Das Spaltungsende wird mit HPLC ermittelt. Hierbei zeigt sich, daß ein Teil der RNA-Fragmente nicht dephosphoryliert wird. Alle anschließenden Reinigungsschritte an QAE-Sephadex A-25 werden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt: eluiert wird mit Tris-HCl auf pH 7,5 gepufferter NaCl-Lösung im linear steigenden Gradienten ab 0,1 M bis max. 0,6 M NaCl. Um eine schnelle Wiederverfügbarkeit der Säulen zu haben, wird der Ionenaustauscher in der Säule regeneriert. Bei diesem Reinigungsschritt (Schritt III. in Schema 3) werden die nicht dephosphorylierten Produkte aufgrund ihrer zu schlechten UV-Verhältnisse verworfen *). Aus den höhermolekularen Fraktionen lassen sich nach der Dephosphorylierung mehrere Peaks isolieren. Aufgrund des immer noch hohen Anteils an Nebenprodukten wird nur eine geringe Auflösung der Peaks im höhermolaren Salz erreicht. Papierchromatographische Untersuchung der Produkte in den Systemen A und B zeigt, daß erst von Peak IV (s. Fig. 5 und 6) an und bis Peak IX, nur Produkte der Kettenlänge drei und vier zu erhalten sind, Peak I_a bis III_a aus Fig. 6 werden daher verworfen. In Fig. 6 sind die Elutionsprofile der dephosphorylierten Produkte dargestellt. In Tabelle 6 sind die Ausbeuten an dephosphorylierten RNA-Fragmenten zusammengestellt.

*) Die gereinigten nicht dephosphorylierten Fraktionen verändern sich auch bei einer weiteren Phosphatasebehandlung nicht.

Tabelle 6. Ausbeuten der einzelnen Peaks aus Fig. 6.

Peak	IV_a	V_a	VI_a	VII_a	$VIII_a$	IX_a	X_{a1}	X_{a2}	XI_{a1}	XI_{a2}	XI_{a3}	XI_{a4}
mg	320	100	470	950	230	480	260	230	360	320	290	310


a)
b)
c)
I_a
II_a
III_a
$A_{254\,nm}$
NaCl-Konz. [mol/l]
0,4
0,3
0,2
0,1
1
3
5
7
Elutionsvol. [l]


d)
e)
f)
g)
IV$_a$
V$_a$
VI$_a$
VII$_a$
0,4
0,3
0,2
0,1
NaCl-Konz. [mol/l]
A$_{254\ nm}$
4
6
8
Elutionsvol. [l]

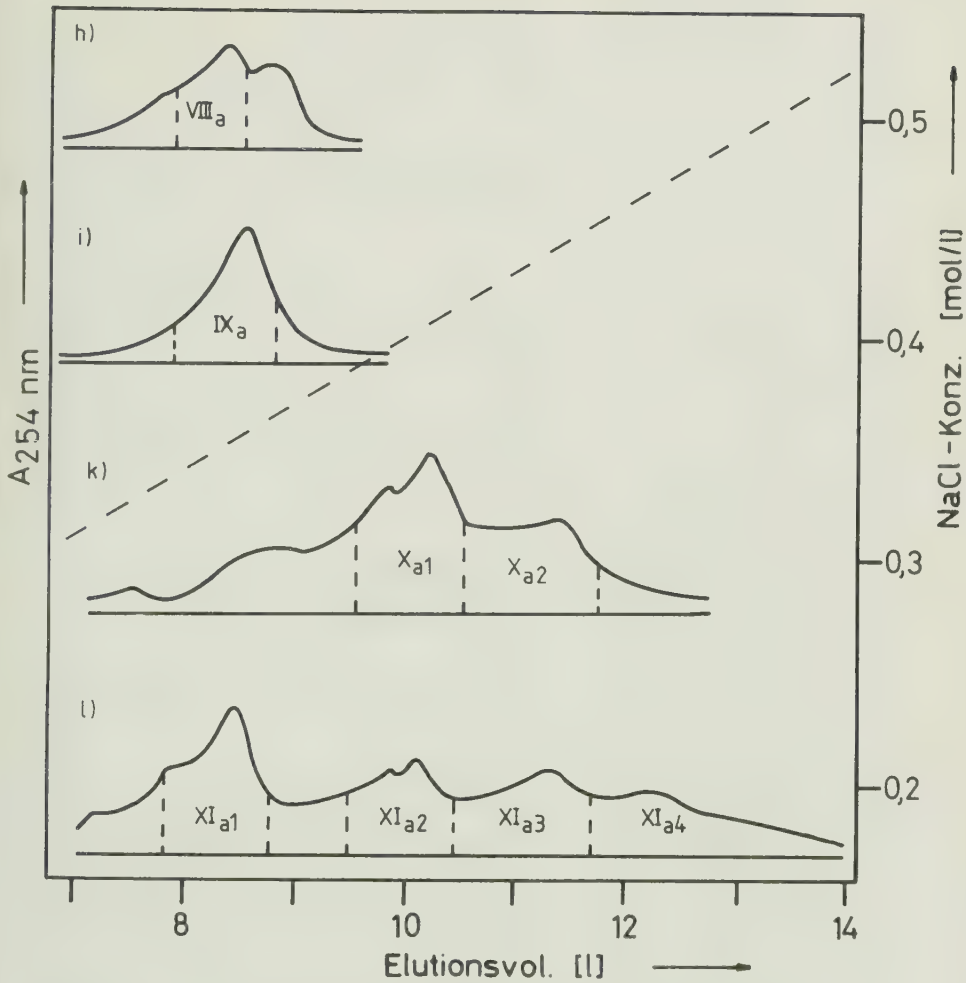


Fig. 6. Automatisch registrierte Elutionsprofile, unterschiedliche Mengen von Vorlauf (ohne Produkt) wurden nicht aufgezeichnet, der säulenchromatographischen Trennung an QAE-Sephadex A-25 (70 x 3 cm mit Vorsäule 6 x 1,5 cm) der mit Phosphatase behandelten Peaks aus Fig. 5. Auftrag: s. Tab. 5. Die Säule wird bei Raumtemperatur im linear steigenden NaCl-Gradienten, beginnend bei 0,1 M, eluiert, der mit 25 mM Tris-HCl auf pH 7,5 gepuffert ist. Durchfluß: 400 ml/h. Peaks mit pU-nahen UV-Verhältnissen und einer Kettenlänge von drei und länger werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und lyophilisiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefaßt.

Zur Abspaltung des 3'-terminalen Nucleosides werden die Oligomeren mit $NaIO_4$ in einmolarem Lysin-HCl Puffer pH 8,1 bei 45°C behandelt. Die Kontrolle des Spaltungsverlaufes mit HPLC an Partisil-10 SAX zeigt wie der sofort entstandene Dialdehyd langsam eliminiert wird und erneut ein Produkt mit 3'-terminalem Phosphat entsteht. In Fig. 7 wird der Spaltungsverlauf am Beispiel eines Trimeren (Peak VII_a in Fig. 6g), in Fig. 8 am Beispiel eines Hexameren (Peak XI_{a3} in Fig. 6l) gezeigt. Deutlich wird beim Hexameren die Zunahme der Produktreinheit nach den chromatographischen Aufarbeitungen an QAE-Sephadex A-25 (Fig. 8e und i). Die Produkte $(Up)_n$ werden unter den gleichen Bedingungen chromatographiert (Schritt IV. in Schema 3) wie die Oligomeren vor der Spaltung, $(Up)_nR$. Fig. 9 zeigt die Elutionsprofile der chromatographischen Reinigung von $(Up)_n$ an QAE-Sephadex A-25. Obwohl durch die Abspaltung des 3'-terminalen Nucleosides im Oligomeren eine zusätzliche Ladung entsteht, werden die entstandenen Oligouridylsäure-3'-phosphate (Peak "I") mit niedermolarerem Salz eluiert als die Ausgangsprodukte. Dies läßt sich durch starke Wechselwirkungen zwischen der Dextranmatrix des QAE-Sephadex und den 3'-terminalen Nucleosiden Inosin bzw. Xanthosin erklären. Anders verhält sich Peak IV_b/V_b. Die UV-Verhältnisse der Peaks IV_a und V_a zeigen keinen typischen Inosin- bzw. Xanthosinanteil, diese Peaks werden daher mit niedrigerer Salzkonzentration als der von der Kettenlänge entsprechende Peak IX_a eluiert. Nach Abspaltung des 3'-terminalen Nucleosides wird aus allen diesen Peaks $(Up)_3$, sie werden dann bei gleicher Salzkonzentration eluiert. Peak "II" in den Chromatogrammen entspricht von der Salzstärke den Ausgangsprodukten, hat aber schlechtere UV-Verhältnisse als diese. Da der Peak "II" oft den größeren Teil der Spaltung ausmacht, wird versucht, ihn mit Perjodat erneut zu spalten. Dies gelingt nicht, es muß sich demnach hierbei um Verunreinigungen der RNA handeln, die terminal weder eine Phosphatgruppe, noch zwei cisständige Hydroxylfunktionen aufweisen.

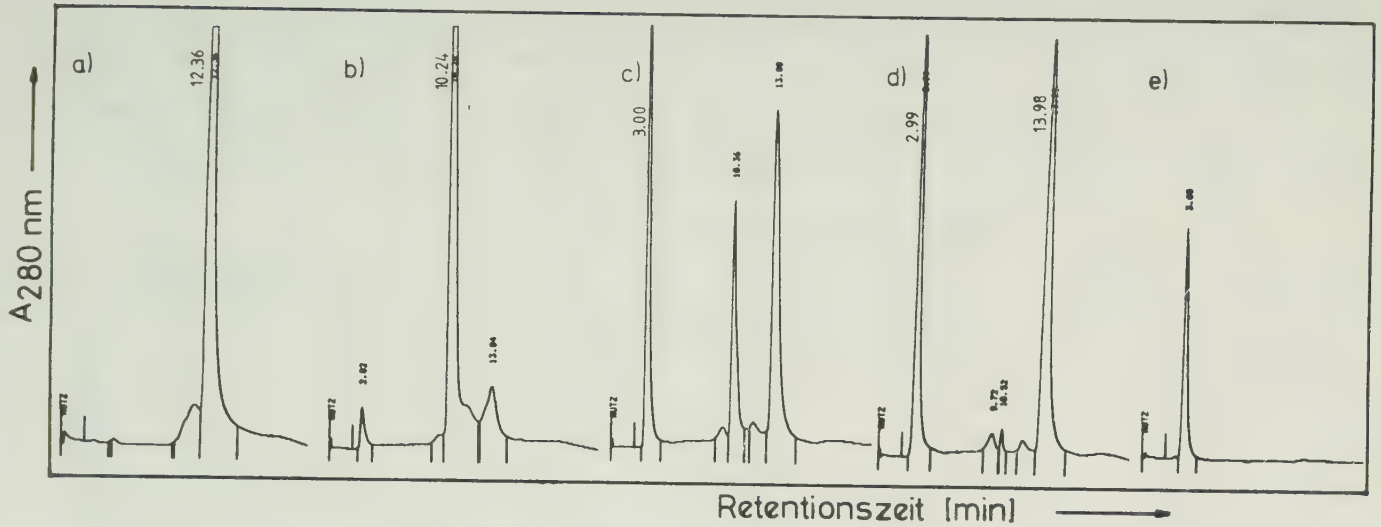


Fig. 7. Kontrolle der Eliminierung des 3'-terminalen Nucleotides pR (vgl. Schema 2) aus U-UpR (Peak VII_a in Fig. 6g) mit HPLC. Säule Partisil-10 SAX (250 x 4,6 mm); Puffer A: 1 mM Ammoniumsulfat pH 5,0 in Formamid:H_2O (60:40, v/v), Puffer B: A mit 240 mM Ammoniumacetat pH 5,0; linearer Gradient von 0% B nach 99,9% B von 3. bis 28. min; Flußrate 1 ml/min; Detektion 280 nm. a) Ausgangsprodukt U-UpR (t_R=12,36 min); b) vollständige Umsetzung zum Dialdehyd (t_R=10,24 min) nach 2 min Behandlung bei 20°C mit 25 mM Natriumperjodat in 1 M Lysin-HCl pH 8,1; c) nach 35 min bei 45°C 2/3 Abbau des Dialdehyds zum U-Up (t_R=13,88min) unter Bildung von Purinbase, IO_3^- und Spaltprodukten (t_R=3,00 min); d) nach 70 min bei 45°C vollständige Bildung von U-Up (t_R=13,96 min); e) gebildetes U_2 aus chromatographisch an QAE-Sephadex A-25 gereinigtem U-Up nach 2 h Behandlung mit alkalischer Phosphatase bei 37°C (Peak VII_c in Fig. 10a).

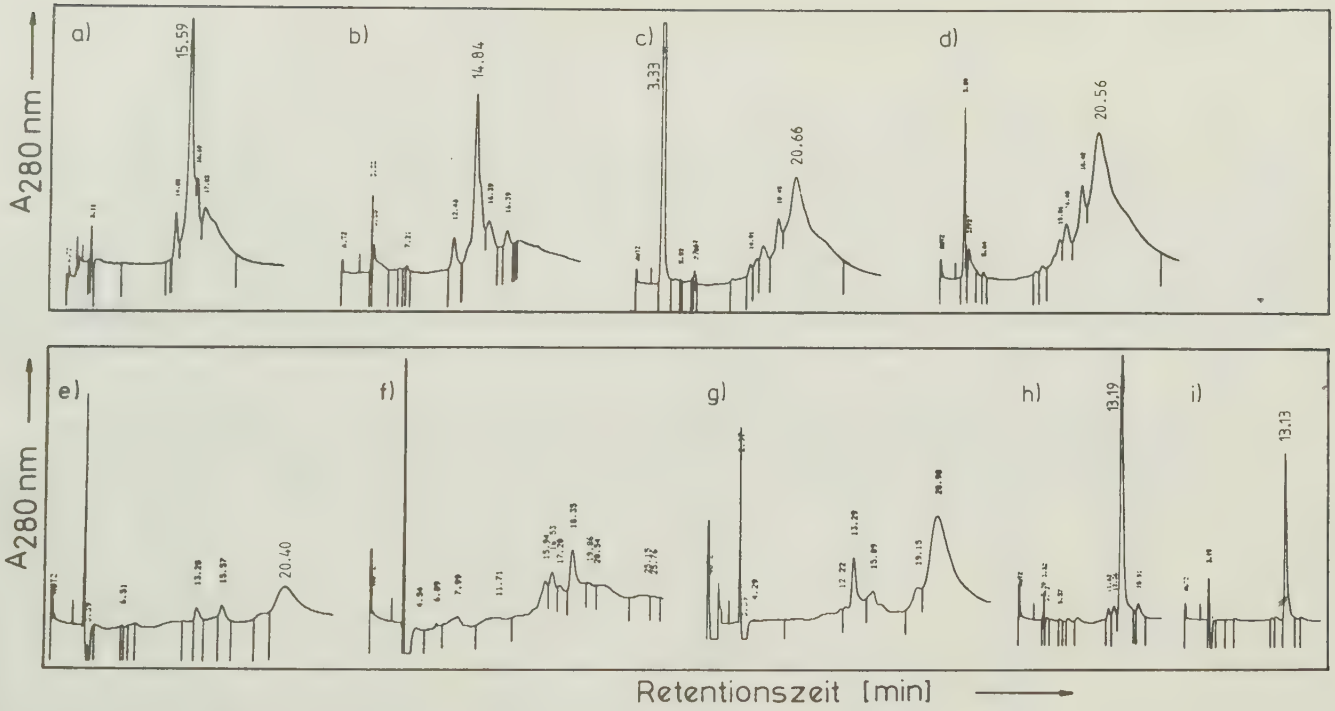


Fig. 8. Kontrolle der Eliminierung des 3'-terminalen Nucleotides pR (vgl. Schema 2) aus U-U-U-U-UpR (Peak XI_{a3} in Fig. 61) mit HPLC. Chromatographische Bedingungen wie in Fig. 7. a) Ausgangsprodukt $(U_5)pR$ (t_R=15,59 min); b) gebildeter Dialdehyd (t_R=14,84 min) nach 2 min Behandlung bei 20°C mit 25 mM Natriumperjodat in 1 M Lysin-HCl pH 8,1; c) nach 60 min bei 45°C vollständiger Abbau des Dialdehyds und Bildung von Purinbase, IO_3^-, Spaltprodukten (t_R=3,33 min) und $(U_5)p$ (t_R=20,66 min); d) nach der Entfernung von Puffer und niedermolekularen Spaltprodukten durch Gelfiltration an Sephadex G-15; e) chromatographisch an QAE-Sephadex A-25 gereinigtes Produkt $(U_5)p$ (Peak I in Fig. 9h) und f) abgetrennte Nebenprodukte (Peak II in Fig. 9h); g) gebildetes U_5 (t_R=13,29 min) nach 2 min Behandlung bei 20°C mit alkalischer Phosphatase; h) vollständige Dephosphorylierung nach 2 h bei 37°C; i) chromatographisch an QAE-Sephadex gereinigtes U_5 (Peak XI_{c3} in Fig. 10k).

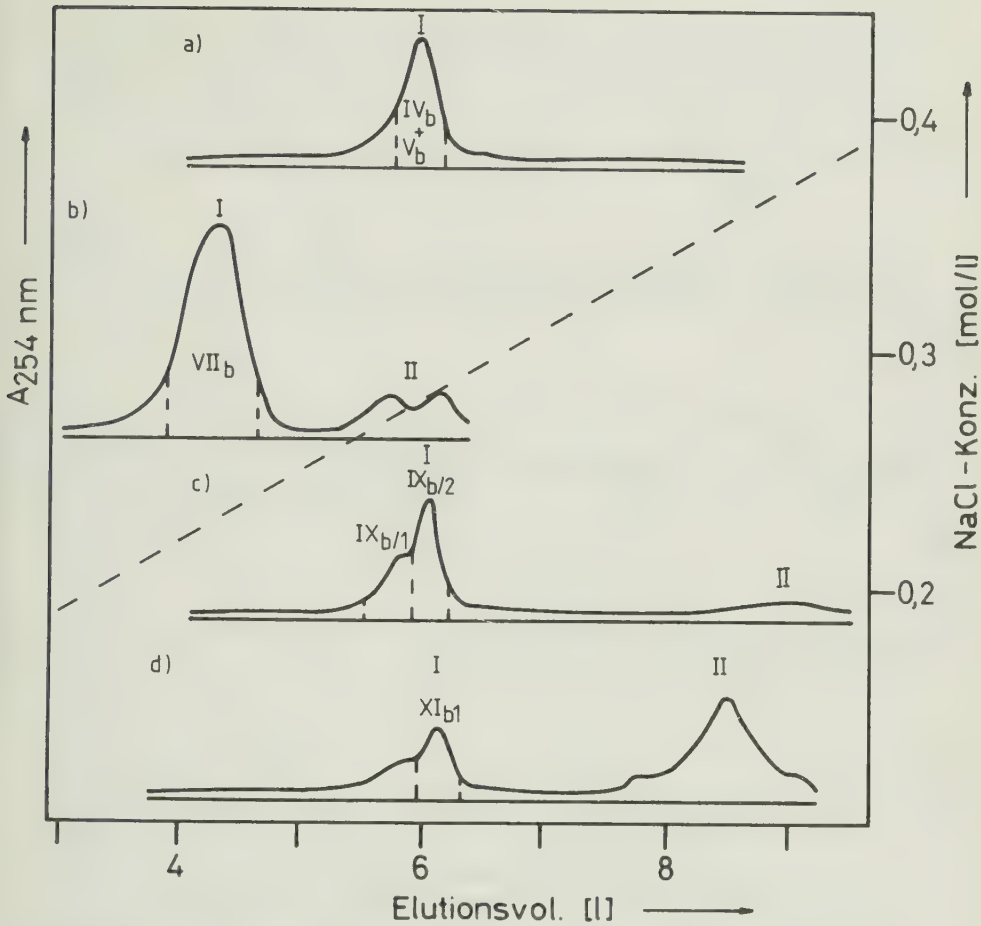
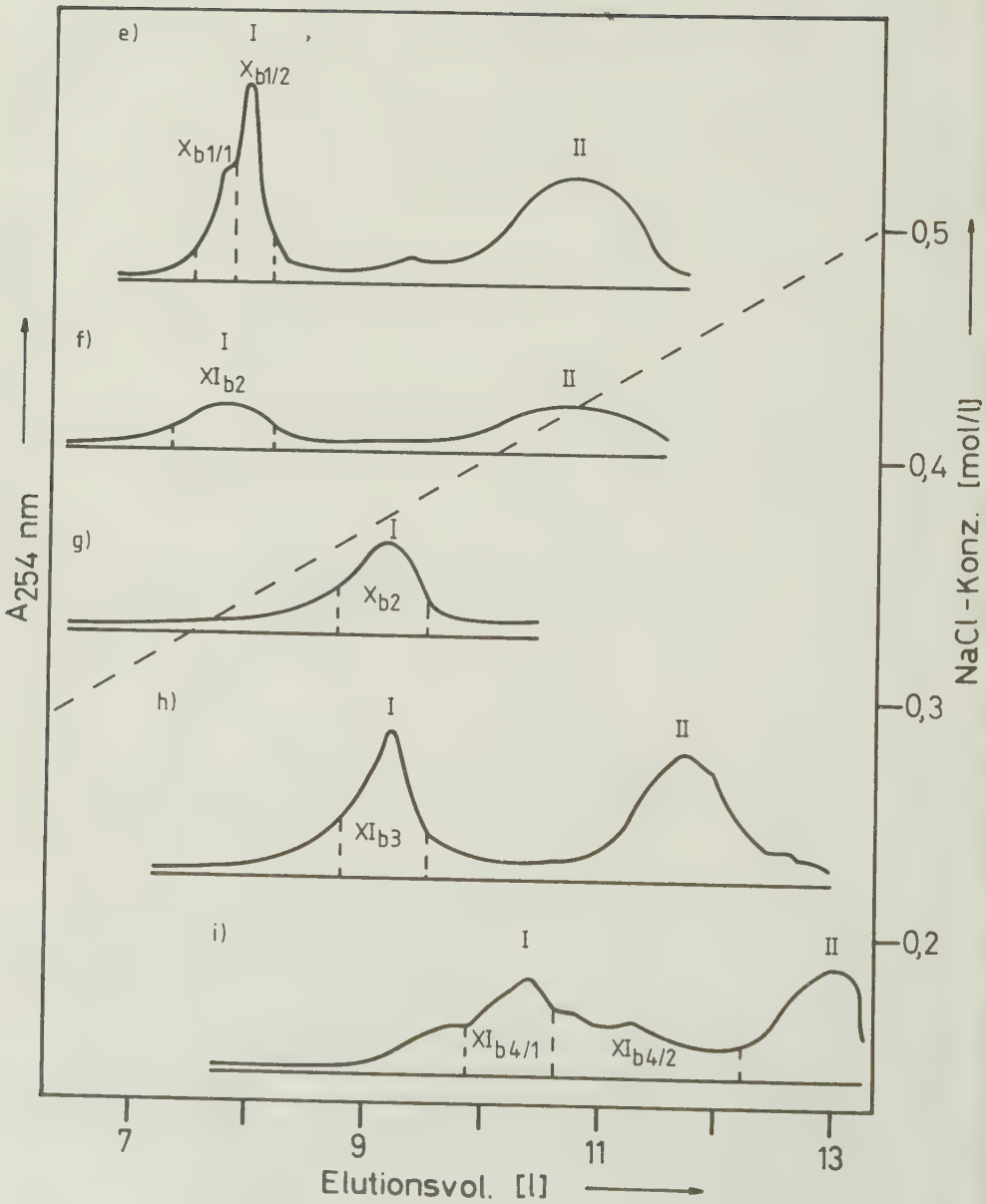


Fig. 9. Automatisch registrierte Elutionsprofile, unterschiedliche Mengen von Vorlauf (ohne Produkt) wurden nicht aufgezeichnet, der säulenchromatographischen Trennung an QAE-Sephadex A-25 (70 x 3 cm mit Vorsäule 6 x 1,5 cm) der mit 25 mM Natriumperjodat in 1M Lysin-HCl pH 8,1 gespaltenen Peaks aus Fig. 6. Auftrag: s. Tab. 6. Chromatographische Bedingungen wie in Fig. 6. Peak I: gespaltenes Produkt; die Peak II sind mit Perjodat nicht oxidierbar und entsprechen in ihrem Elutionsverhalten der ungespaltenen Verbindung. Peaks mit pU-nahen UV-Verhältnissen werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und lyophilisiert. Die Ausbeuten und UV-Verhältnisse sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

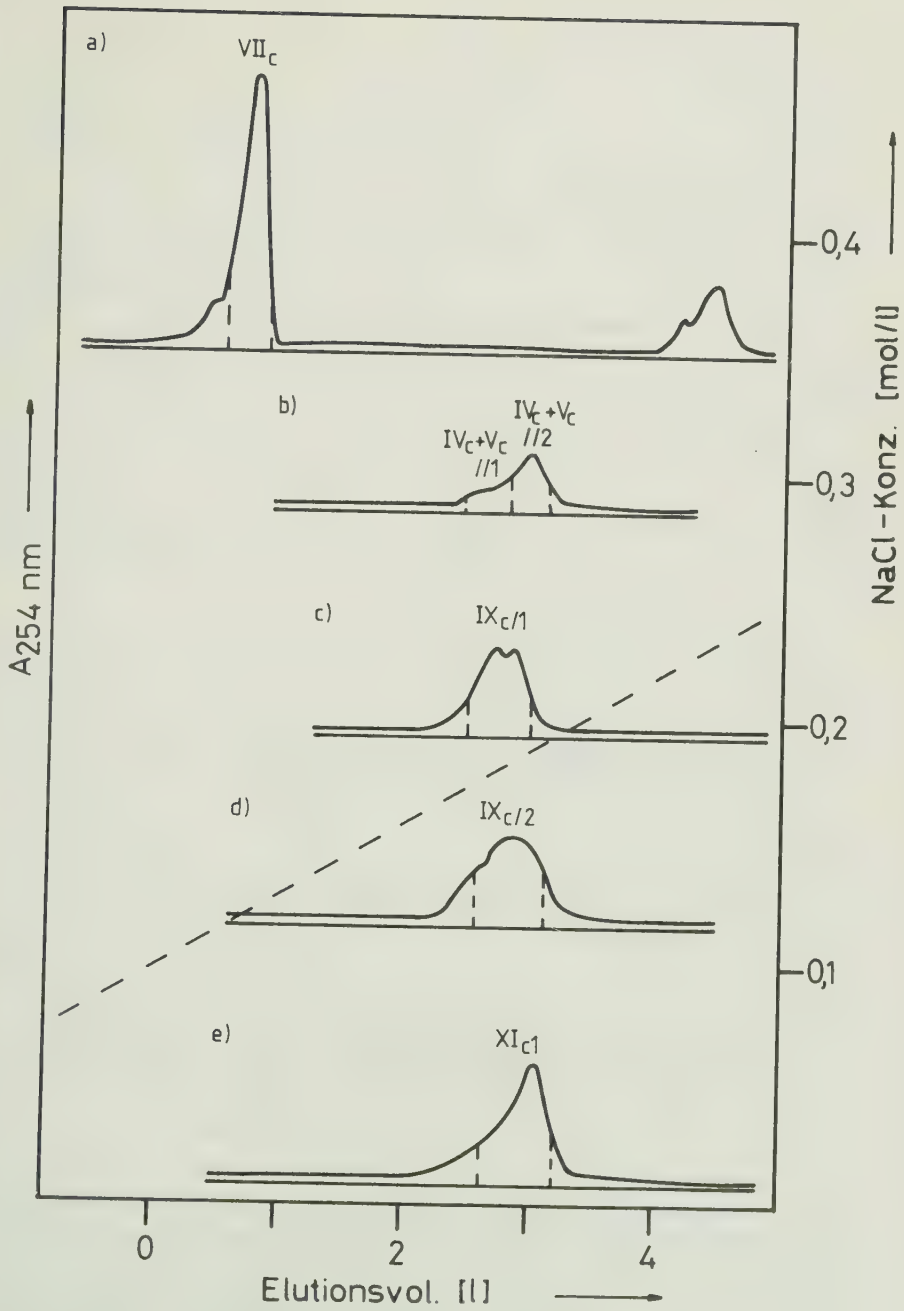

e)
I
$X_{b1/2}$
$X_{b1/1}$
II
f)
I
XI_{b2}
II
g)
I
X_{b2}
h)
I
II
XI_{b3}
i)
I
II
$XI_{b4/1}$
$XI_{b4/2}$
A_{254} nm
0,5
0,4
0,3
0,2
NaCl-Konz. [mol/l]
7
9
11
13
Elutionsvol. [l]

Die Peaks "I" werden jeweils gelchromatographisch an Sephadex G-15 entsalzt und anschließend lyophilisiert. Die Lyophilisate sind reinweiße Flocken. In Tabelle 7 sind die UV-Verhältnisse der chromatographierten Oligouridylsäure-3'-phosphate wiedergegeben.

Tabelle 7. Ausbeuten und UV-Verhältnisse der einzelnen Peaks aus Fig. 9, $(Up)_n$, und Fig. 10, U_n. Die UV-Verhältnisse werden bei pH 7 bestimmt.

$(Up)_n$					U_n				
Peak	Menge [mg]	UV-Verhältnisse 250 nm / 260 nm	280 nm / 260 nm	290 nm / 260 nm	Peak	Menge [mg]	UV-Verhältnisse 250 nm / 260 nm	280 nm / 260 nm	290 nm / 260 nm
IV/V_b	200	0,79	0,34	0,04	$IV/V_{c//1}$	59	0,79	0,37	0,07
					$IV/V_{c//2}$	50	0,80	0,37	0,08
VII_b	270	0,78	0,34	0,04	VII_c	76	0,77	0,34	0,03
$IX_{b/1}$	100	0,83	0,43	0,15	$IX_{c/1}$	58	0,78	0,35	0,04
$IX_{b/2}$	140	0,83	0,44	0,18	$IX_{c/2}$	92	0,77	0,36	0,05
$X_{b1/1}$	50	0,81	0,35	0,05	$X_{c1/1}$	41	0,79	0,36	0,06
$X_{b1/2}$	70	0,80	0,34	0,04	$X_{c1/2}$	59	0,78	0,35	0,05
X_{b2}	125	0,82	0,37	0,08	X_{c2}	50	0,81	0,35	0,05
XI_{b1}	120	0,81	0,34	0,04	XI_{c1}	74	0,79	0,35	0,04
XI_{b2}	100	0,82	0,36	0,07	XI_{c2}	52	0,79	0,35	0,05
XI_{b3}	115	0,82	0,36	0,06	XI_{c3}	55	0,80	0,36	0,05
$XI_{b4/1}$	80	0,85	0,39	0,09	$XI_{c4/1}$	48	0,81	0,36	0,05
$XI_{b4/2}$	75	0,88	0,40	0,11	$XI_{c4/2/1}$	12	0,88	0,39	0,10
					$XI_{c4/2/2}$	10	0,87	0,38	0,09
pU		0,76	0,36	0,04	pU		0,76	0,36	0,04

Ein Vergleich mit den UV-Verhältnissen von käuflichem pU zeigt, daß auch diese Produkte noch verunreinigt sich. Die Oligouridylsäure-3'-phosphate werden analog der ersten Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase behandelt. Nach Kontrolle der Spaltung mit HPLC (vgl. Fig. 7 und 8) - fast alle Produkte lassen sich vollständig spalten - werden die entstandenen Oligouridylsäuren mit Ausnahme von Peak VII_b an QAE-Sephadex A-25 analog den vorherigen Bedingungen gereinigt (Fig. 10 und Schritt V. in Schema 3). Peak VII_b wird im linear steigenden NaCl-Gradienten, 0 bis 0,3 M, eluiert. Peak $X_{c1/1}$ bis $XI_{c4/2/2}$ werden gelchromatograpisch an Sephadex G-15, die anderen Peaks an Sephadex G-10 entsalzt und anschließend lyophilisiert. Tabelle 7 zeigt für die Oligouridylsäuren UV-Verhältnisse nahe denen von pU.


a)
VII$_c$
b)
IV$_c$+V$_c$ //2
IV$_c$+V$_c$ //1
c)
IX$_{c/1}$
d)
IX$_{c/2}$
e)
XI$_{c1}$
A$_{254}$ nm
NaCl-Konz. [mol/l]
0,4
0,3
0,2
0,1
0
2
4
Elutionsvol. [l]

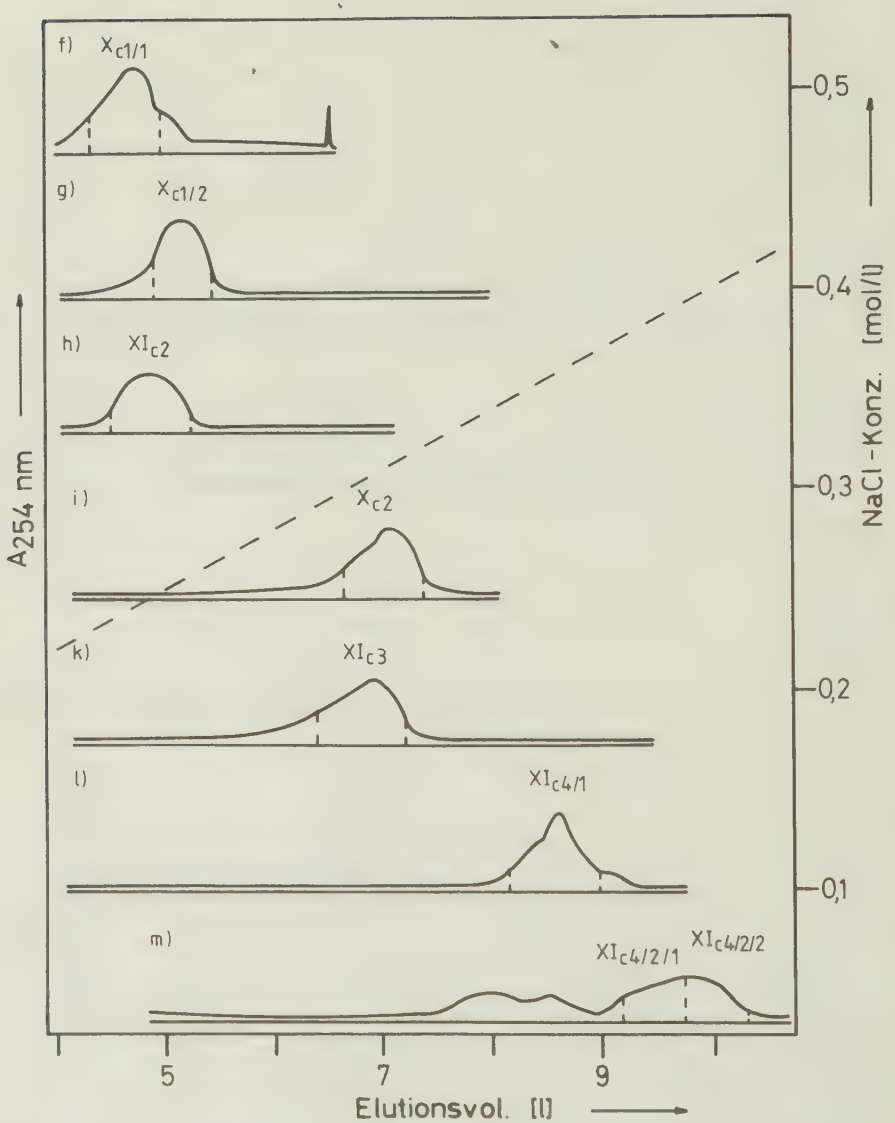


Fig. 10. Automatisch registrierte Elutionsprofile, unterschiedliche Mengen von Vorlauf (ohne Produkt) wurden nicht aufgezeichnet, der säulenchromatographischen Trennung an QAE-Sephadex A-25 (70 x 3 cm mit Vorsäule 6 x 1,5 cm) der mit Phosphatase behandelten Peaks aus Fig. 9. Auftragsmenge, Ausbeuten und UV-Verhältnisse s. Tab. 7. Chromatographische Bedingungen außer a) wie in Fig. 6. Für Peak VII_C (a) beginnt der linear steigende Gradient bei 0 M NaCl. Die Peaks werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, entsalzt und lyophilisiert.

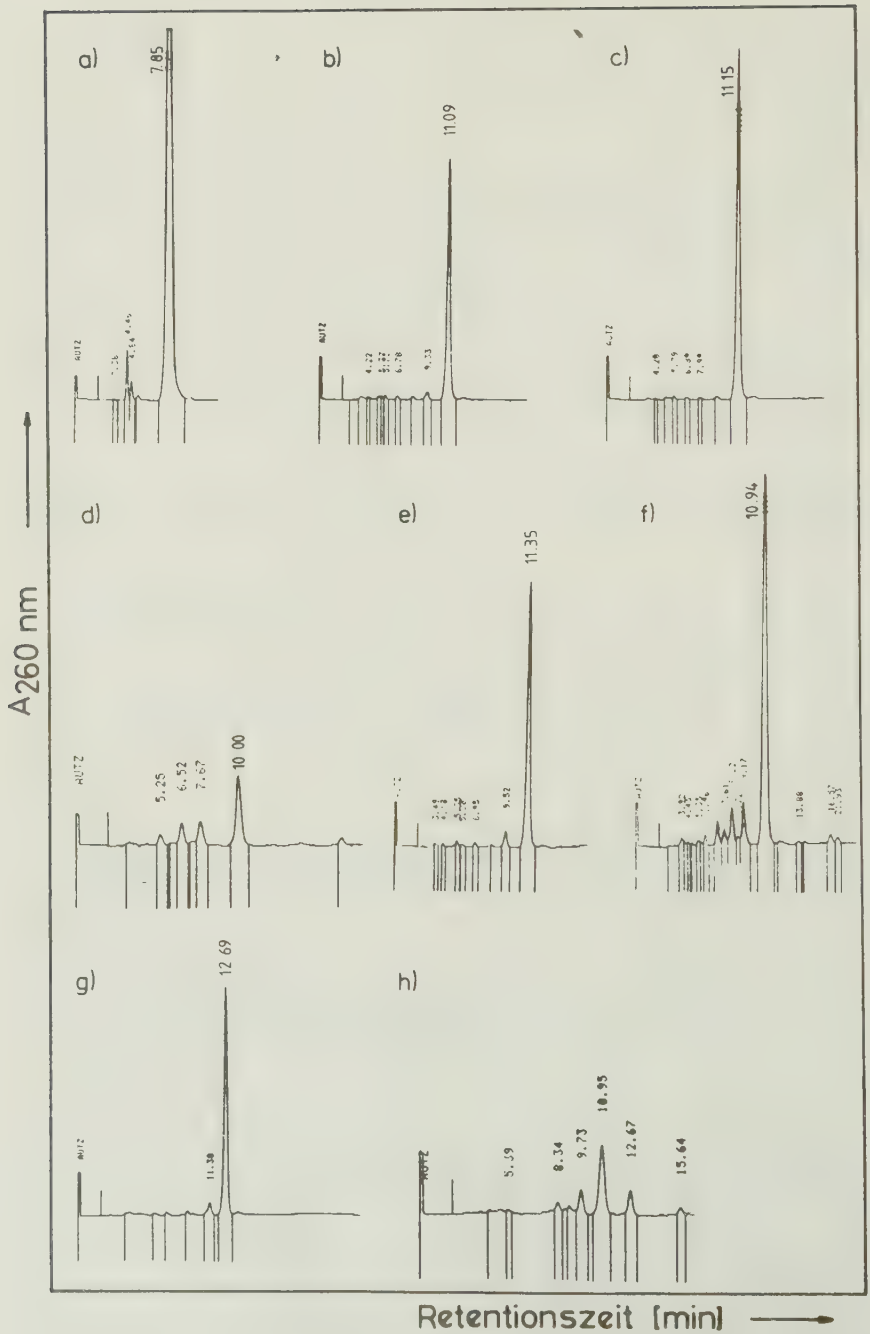
3.3 Reinheitskontrolle der Oligouridylsäuren mit HPLC an reverser Phase und präparative Nachreinigung

Die chromatographisch an QAE-Sephadex A-25 gereinigten Oligouridylsäuren werden mit HPLC auf ihre Reinheit überprüft. Hierbei wird reverse Phase verwendet. Der Phasenwechsel von polar nach unpolar hat zwei Vorteile:

a) Reversed-Phase HPLC-Säulen haben gegenüber den Anionenaustauscher HPLC-Säulen ca. 2-3 mal mehr theoretische Böden und daher eine entsprechend bessere Auflösung;

b) durch den Phasenwechsel können Komponenten getrennt werden, die sich durch Ionenaustauschchromatographie nicht trennen ließen (68).

Die Untersuchung der aus 3.2 erhaltenen Oligouridylsäuren wird durchgeführt an Nucleosil $7C_{18}$ im steigenden Methanolgradienten, gepuffert mit Ammoniumacetat auf pH 5,6. Ammoniumacetat hat als flüchtiger Puffer den Vorteil, daß es sich durch Lyophilisieren entfernen läßt; bei pH kleiner 6 erhält man an Nucleosil $7C_{18}$ eine gute Abtrennung U von I und X. Der Gradient wird so gewählt, daß das kürzeste Produkt, U_2, nach ca. 7 min eluiert wird (bei einer Totzeit t_0 = 2 min) und das längste Produkt, U_8, nach ca. 16 min. Die Verwendung nur eines Gradienten erlaubt die schnelle Zuordnung von Nebenprodukten als U_n bzw. als Verunreinigung. Die Elutionsprofile (Fig. 11) zeigen neben dem Hauptprodukt einen wechselnden Anteil an Homologen und an Verunreinigungen. Die Peaks sind in Tab. 8 mit Reinheitsangaben und Retentionszeiten zusammengefaßt. Bei weniger als 95% Hauptprodukt wird die Verbindung an einer präparativen Reversed-Phase HPLC-Säule (LiChrosorb RP-18) nachgereinigt (Schritt VI. in Schema 3). Fig. 12 zeigt die Elutionsprofile der präparativen Reinigung.


a)
7.85
b)
11.09
c)
11.15
d)
5.25
6.52
7.67
10.00
e)
11.35
f)
10.94
g)
11.38
12.69
h)
5.59
8.34
9.73
10.93
12.67
15.64
A260 nm
Retentionszeit [min]

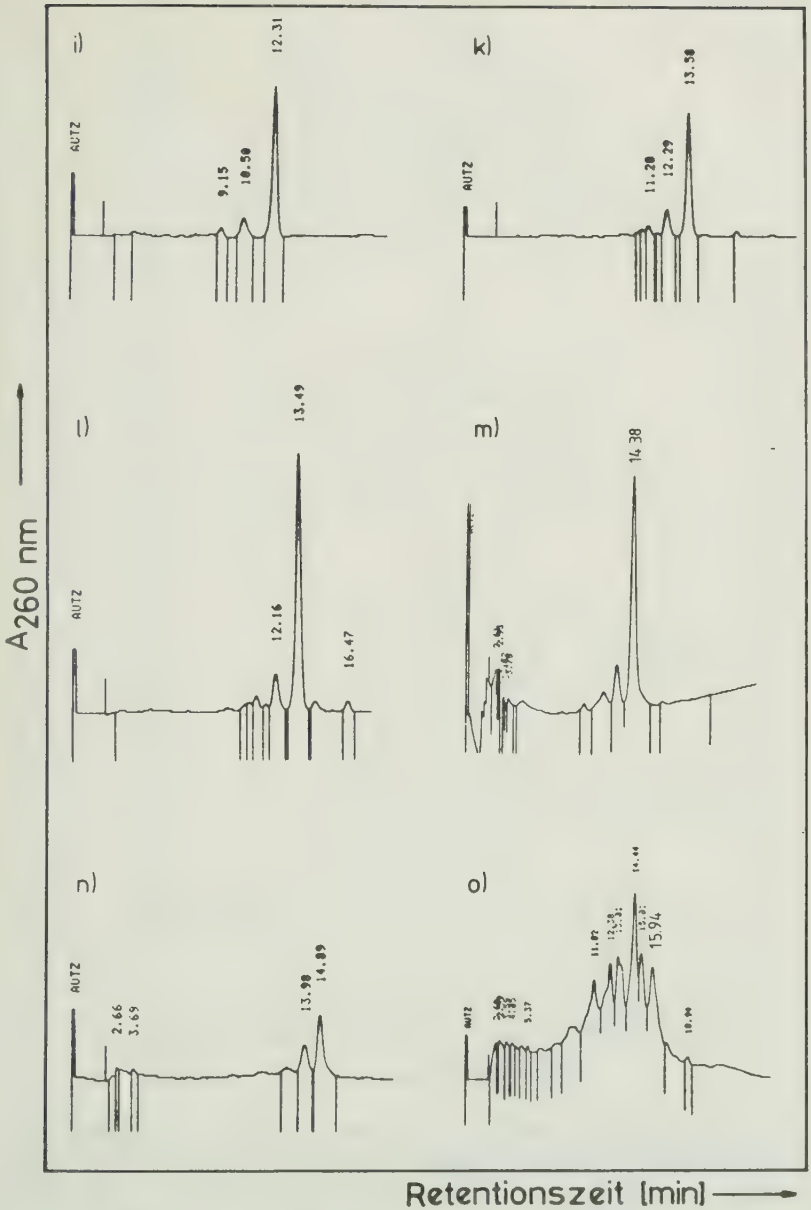


Fig. 11. Reinheitskontrolle der Oligouridylsäuren aus Fig. 10 mit HPLC. Säule: Nucleosil $7C_{18}$ (250 x 4,6 mm); Puffer A: 10 mM Ammoniumacetat pH 5,6, Puffer B: 10mM Ammoniumacetat pH 5,6 in Methanol:Wasser 80:20 (v/v); linearer Gradient von 10% B nach 30% B in 25 min; Flußrate 1 ml/min; Detektion und Integration bei 260 nm. Die Zuordnung der Peaks ist in Tab. 8 aufgeführt.

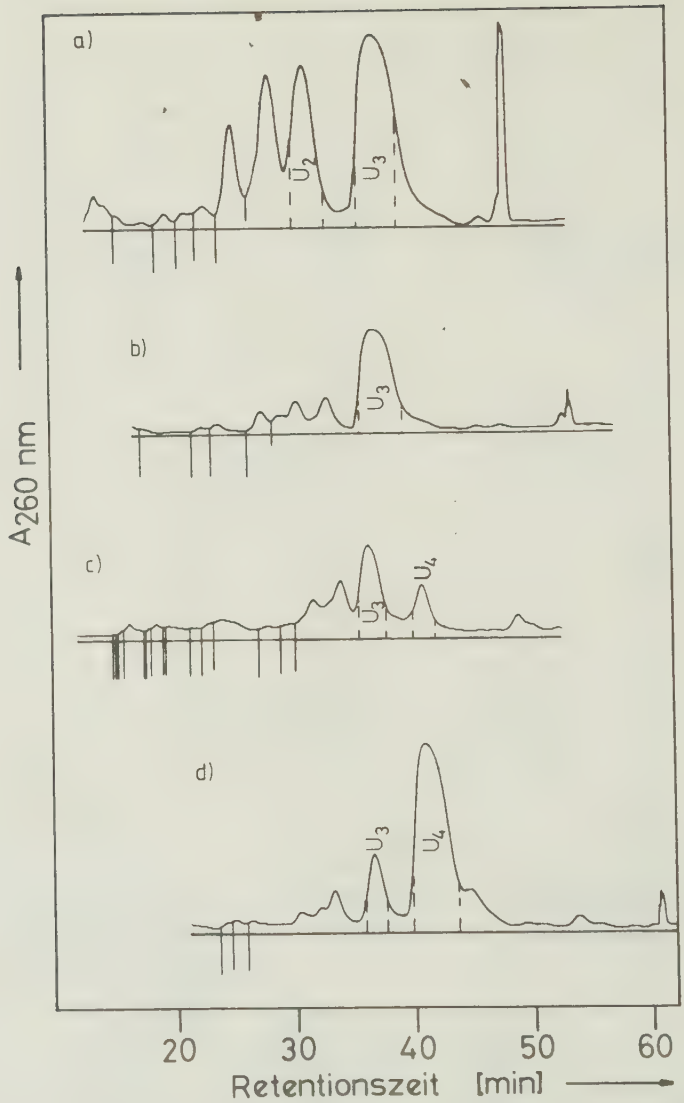


Fig. 12. Reinigung der Oligouridylsäuren aus Fig. 10 und 11 mit präparativer HPLC. Unterschiedliche Mengen von Vorlauf (ohne Produkt) wurden nicht aufgezeichnet. Säule: LiChrosorb RP-18 10 µm (250 x 32 mm); Puffer A: 10 mM Ammoniumacetat pH 5,6, Puffer B: Methanol; linearer Gradient von 5% B nach 12% B in 50 min; Flußrate 10 ml/min; Detektion bei 260 nm. a) Peak $IX_{c/1}$; b) Peak XI_{c1}; c) Peak $X_{c1/2}$; d) Peak XI_{c2}; e) Peak X_{c2}; f) Peak XI_{c3}; g) Peak $XI_{c4/1}$; h) Peak $XI_{c4/2/1}$; i) Peak $XI_{c4/2/2}$. Peaks werden innerhalb der senkrechten Strichelung vereinigt, an einer analytischen Nucleosil $7C_{18}$-Säule zugeordnet und lyophilisiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 zusammengefaßt.

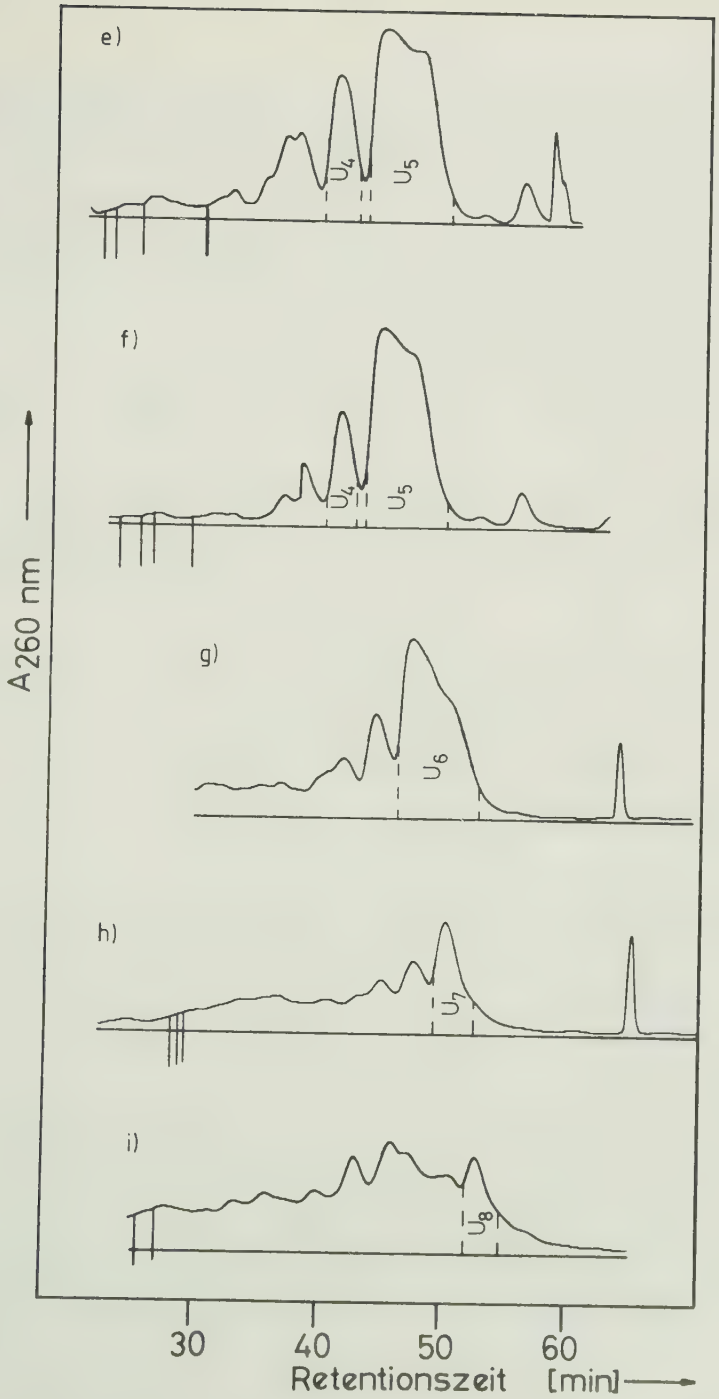

e)
U4
U5
f)
U4
U5
g)
U6
h)
U7
i)
U8
A260 nm
30
40
50
60
Retentionszeit [min]

Tabelle 8: Zuordnung der Peaks aus Fig. 11. Produkte mit Prozentangaben werden an einer präparativen Reversed-Phase HPLC-Säule nachgereinigt (Fig. 12).

Fig.11	Peak in Fig. 10	Hauptprodukt		Nebenprodukt	
		U_n	t_R [min]	U_n	t_R [min]
a)	VII_c	U_2	7,85		
b)	$IV_{c//1}$ u. $V_{c//1}$	U_3	11,09		
c)	$IV_{c//2}$ u. $V_{c//2}$	U_3	11,15		
d)	$IX_{c/1}$	62% U_3	10,00	17% U_2	7,67
e)	$IX_{c/2}$	U_3	11,35		
f)	XI_{c1}	78% U_3	10,94		
g)	$X_{c1/1}$	U_4	12,69		
h)	$X_{c1/2}$	62% U_3	10,95	16% U_4	12,67
i)	XI_{c2}	83% U_4	12,31	14% U_3	10,50
k)	X_{c2}	80% U_5	13,58	17% U_4	12,29
l)	XI_{c3}	80% U_5	13,49	11% U_4	12,16
m)	$XI_{c4/1}$	86% U_6	14,38		
n)	$XI_{c4/2/1}$	64% U_7	14,89		
o)	$XI_{c4/2/2}$	16% U_8	15,94		

Beim "scaling-up" von der analytischen zur präparativen Trennung wird der Gradientenstartpuffer so festgelegt, daß die Elutionszeit von U_2 gleich 3 x t_0 (t_0 = 10 min) ist. Der Gradient wird so eingestellt, daß U_8 nach ca. 55 min eluiert wird. Dieser im Vergleich zur analytischen Trennung deutlich steilere Gradient spart Lösungsmittel und Zeit, erlaubt aber dennoch, die Homologen und die Verunreinigungen voneinander zu trennen. Die Peaks werden von Hand fraktioniert. Verunreinigungen werden durch Bestimmung der UV-Verhältnisse ermittelt und verworfen. Die Peaks werden innerhalb der senkrechten Strichelung (Fig. 12) vereinigt und an der analytischen Säule zugeordnet. Hierbei wird zur Erzielung einer hohen Auflösung ein flacher Gradient gewählt: U_2 wird nach

ca. 10 min, U_8 nach ca. 24 min eluiert. Peaks aus Fig. 12, die gemeinsam eingespritzt von der analytischen Säule wieder als ein Peak eluiert werden, werden vereinigt und lyophilisiert. Fig. 13 zeigt die unter isokratischen Bedingungen erfolgte analytische Kontrolle der vereinigten Produkte U_2 bis U_8. Die Chromatogramme zeigen bei 260 nm weniger als 8% Verunreinigungen, bei U_8 14% Verunreinigung. Zur weiteren Bestätigung der homologen Reihe U_2 bis U_8 werden die Produkte papierchromatographisch im Laufmittel B untersucht. In Tabelle 9 sind die UV-Verhältnisse, A_{260}- und mg-Mengen der isolierten Oligouridylsäuren sowie deren R_f-Werte bezogen auf pU zusammengestellt.

Tabelle 9. Nach präparativer Trennung an LiChrosorb RP-18 mit HPLC erhaltenen Oligouridylsäuren U_2 bis U_8 mit A_{260}- und mg Mengen, UV-Verhältnisse bei pH 7 und papierchromatographische R_f-Werte bezogen auf pU in n-Propanol/konz. NH_3/Wasser 55:10:35 (v/v/v).

	A_{260}-Einheiten	Menge [mg]	UV-Verhältnisse			R_f-Werte
			250 nm / 260 nm	280 nm / 260 nm	290 nm / 260 nm	
U_2	2.200	76	0,79	0,36	0,05	1,18
U_3	6.050	275	0,78	0,34	0,03	0,99
U_4	3.300	151	0,79	0,34	0,04	0,72
U_5	850	30	0,78	0,35	0,04	0,47
U_6	270	10	0,80	0,34	0,03	0,36
U_7	55	2	0,81	0,33	0,04	0,26
U_8	15	1	0,84	0,34	0,04	0,17

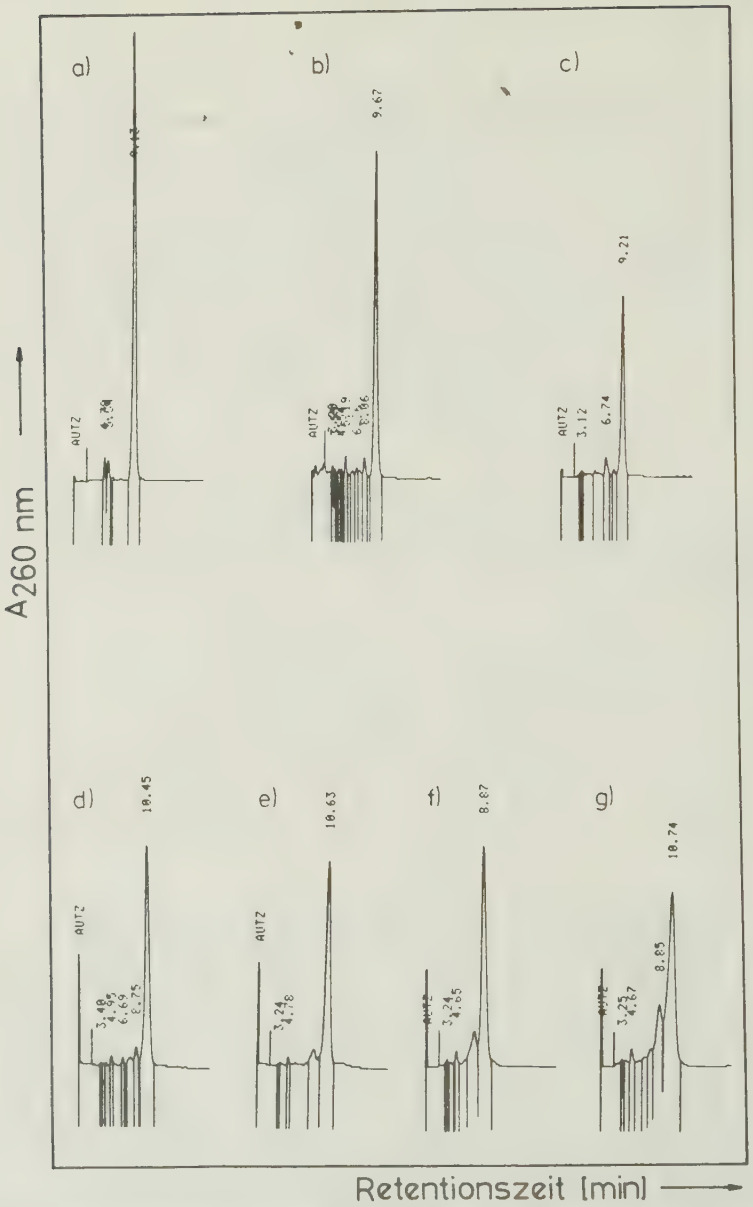


Fig. 13. Reinheitskontrolle von U_2 bis U_8 mit HPLC unter isokratischen Bedingungen. Säule: Nucleosil $^7C_{18}$ (250 x 4,6 mm); Puffer: 10 mM Ammoniumacetat pH 5,6 und Methanol (v/v) s.u.; Flußrate 1 ml/min; Detektion und Integration bei 260 nm; Reinheitsangaben in Klammern. a) U_2 (95%), 8,7% Methanol; b) U_3 (92%), 9,5% Methanol; c) U_4 (92%), 10,2% Methanol; d) U_5 (94%), 10,7% Methanol; e) U_6 (95%), 11,1% Methanol; f) U_7 (92%), 11,5% Methanol; g) U_8 (86%), 11,7% Methanol.

3.4 Kontrolle an HPLC der Kettenlänge und der homologen Nucleosidzusammensetzung durch enzymatischen Abbau mit Phosphodiesterase und Phosphatase

Die UV-Verhältnisse (s. Tabelle 9) der durch präparative Trennung an LiChrosorb RP-18 erhaltenen Oligouridylsäuren entsprechen nicht völlig denen von Uridin. Dies kann durch chromatische Effekte bzw. durch Verunreinigung mit z.B. Fehlsequenzen mit Inosin bedingt sein. Zum Nachweis eventuell noch vorhandener Inosin- bzw. Xanthosineinheiten wird von den isolierten Oligouridylsäuren die Nucleosidzusammensetzung bestimmt. Hierzu wird ein Aliquot der Oligouridylsäuren mit Phosphodiesterase und Phosphatase zu den Nucleosiden abgebaut. Der Phosphodiesterabbau wird weiterhin auch noch zur Kontrolle der Kettenlänge durch Bestimmung des Verhältnisses U zu pU der mit HPLC aufgetrennten Hydrolysate benutzt.

Phosphodiesterase (aus Schlangengift) ist eine Exonuclease und greift DNA wie RNA an der 3'-terminalen Hydroxylgruppe unter Abspaltung von 5'-Mononucleotiden an. Beim Abbau von U_n erhält man so Uridin und (n-1) 5'-Uridinphosphate. Zur Bestimmung des Verhältnisses U:pU werden die Oligouridylsäuren nach dem Abbau mit Phosphodiesterase an einer Nucleosil $7C_{18}$ Säule chromatographiert (Fig. 14). Aus den Verhältnissen der Peakflächen von U zu pU - 1:1 für U_2 bis 1:6 für U_7 - läßt sich die Kettenlänge der Oligouridylsäuren bestätigen; die Elutionsprofile enthalten meist noch 5-10% Spaltungszwischenstufen, die bei der Bestimmung der Verhältnisse berücksichtigt werden. Diese Spaltungszwischenstufen werden durch längere Inkubation abgebaut, dies ist jedoch nicht sinnvoll, da gleichzeitig auch langsam pU zu U abgebaut wird (80) und dadurch die Kettenlänge nicht mehr bestimmt werden kann. Bei U_8 gelingt die Bestimmung der Kettenlänge aufgrund des höheren Anteils an Nebenprodukten nicht mehr. Bei dieser Analyse sind eventuell vorhandene Inosin- bzw. Xanthosin-5'-phosphate noch nicht nachweisbar, da sie praktisch gemeinsam mit pU eluiert werden. Zur Bestimmung der Nucleosidzusammensetzung werden die durch Abbau mit Phosphodiesterase erhaltenen Hydrolysate mit

Phosphatase zu den Nucleosiden weiter abgebaut. Die Nucleoside U, I und X lassen sich bei pH 5,6 an Nucleosil $7C_{18}$ im Methanolgradienten gut voneinander trennen, U wird nach ca. 3,5 min eluiert, I nach ca. 6,5 min und X nach ca. 7,5 min. Hierbei zeigt sich (s. Fig. 15), daß von U_2 bis U_7 über 99% des Hydrolysates aus U besteht, bei U_8 besteht das Hydrolysat zu 97% aus dU.

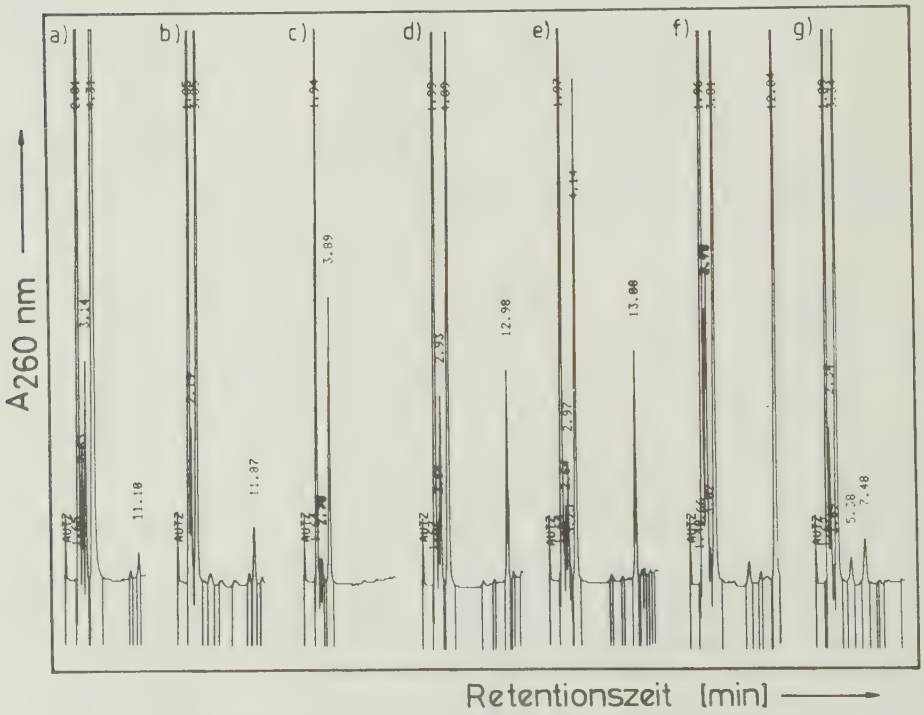


Fig. 14. Elutionsprofile der HPLC nach Hydrolyse der Oligouridylsäuren mit Phosphodiesterase aus Schlangengift. Säule: Nucleosil $7C_{18}$ (100 x 4,6 mm); Puffer A: 50 mM Ammoniumacetat pH 5,6, Puffer B: 50 mM Ammoniumacetat pH 5,6 in Methanol:Wasser 80:20 (v/v); linearer Gradient von 0% B nach 20% B von 1. bis 15. min; Flußrate 1 ml/min; Detektion und Integration bei 260 nm. a) bis g) entspricht den Hydrolysaten von U_2 bis U_8.

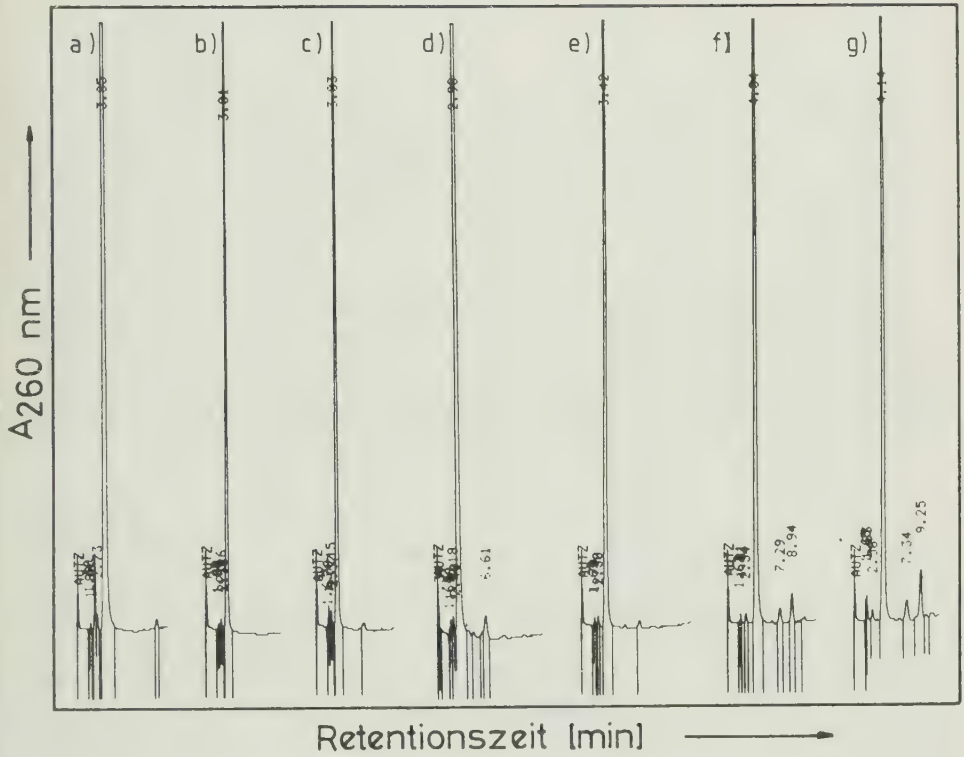


Fig. 15. Elutionsprofile der HPLC nach Hydrolyse der Oligouridylsäuren mit Phosphodiesterase aus Schlangengift und Phosphatase. Chromatographische Bedingungen wie in Fig. 14. a) bis g) entspricht den Hydrolysaten von U_2 bis U_8.

C Experimenteller Teil

1 Geräte und Material

Nieder- und Mitteldruckflüssigchromatographie werden ausgeführt mit einer pericyclischen Pumpe von Roth, Karlsruhe, interfacegesteuert durch ISCO-Fraktionssammler FOXY 2200 mit Peak-Detektor, Schreiber, optischer Einheit Typ 6 und präparativem Rack von Colora, Lorch. Analytische und präparative HPLC bis 10 ml/min werden durchgeführt mit dynamischem Mischer, variablem UV-Detektor, Integrator und Säulen 250 x 4,6 mm bzw. 250 x 32 mm. UV-Verhältnisse werden mit einem Lambda 5 Spektralphotometer von Perkin-Elmer, Bodenseewerke Überlingen, bestimmt. Ultrafiltriert wird an einer UM-10 Membran Ø 150 mm von Amicon, Witten.

Als Chromatographiematerial wird verwendet QAE-Sephadex A-25, Sephadex G-10 und G-15 von Pharmacia, Uppsala, Schweden; Säulen für die HPLC werden gefüllt mit Nucleosil $7C_{18}$ von Macherey-Nagel, Düren, LiChrosorb RP-18 10 µm von Merck, Darmstadt, und Partisil-10 SAX von Whatman, Maidstone, Kent, England. Methanol und Formamid zur Synthese werden destilliert. Chromatographiepapier Nr. 2316 ist von Schleicher und Schüll, Dassel.

RNA und Uridin-5'-phosphat werden bezogen von pharma waldhof, Mannheim, Kat. Nr. 01023 und 2432 121.

Enzyme werden bezogen: Phosphatase, alkalische, 2500 U/0,45 ml, (EC 3.1.3.1) von Merck, Darmstadt; Phosphodiesterase von Crotalus durissus, 1 mg in 1 ml Glycerin, 50% (v/v), ca. 1,5 U, (EC 3.1.4.1), RNase T_1, 500000 units/ml, (EC 3.1.27.3) und RNase U_2, 4000 units/vial, (EC 3.1.27.4) von Boehringer Mannheim. RNase U_2 wird vor der Verwendung in 1 ml 20 mM Acetatpuffer pH 4,5 gelöst.

2 Methoden

2.1 Papierchromatographie

Die Papierchromatographie erfolgt absteigend auf Cellulosepapier.
System A: Ethanol/1 M Ammoniumacetat pH 7,5 7:3 (v/v)
System B: n-Propanol/konz. NH_3/Wasser 55:10:35 (v/v/v)

2.2 Säulenchromatographie an QAE-Sephadex A-25

In jeden Säulenauslaß wird ein ca. 5 cm langer Teflonschlauch (HW 15, I.D. 1,6 mm, A.D. 2,4 mm) befestigt, gesichert mit einem Stück Silikonschlauch. Dieses System erlaubt schnellen und sicheren Anschluß durch Überschieben von a) eines Teflonschlauches (HW 11, I.D. 2,4 mm, A.D. 3,2 mm) vom UV-Detektor, b) eines Silikonschlauches (2x1 mm) zum Säulenpacken und -equilibrieren.

2.2.1 Säulenpacken (69)

Der gequollene QAE-Sephadex A-25 Ionenaustauscher wird von überstehendem Wasser befreit, zum 1,5-fachen Volumen mit dem jeweiligen Puffer aufgeschlämmt und im Wasserstrahlvacuum 5 min entgast. Am Säulenauslaß wird ein ca. 1 m langer Silikonschlauch befestigt, dessen Ende zum Abfallbehälter führt. Auf den Säuleneinlaß kommt ein Schlifftrichter (1 l Volumen) als Reservoir. Die Säule wird bei offenem Auslaß ca. 20 cm hoch mit Puffer gefüllt und sofort der gesamte aufgeschlämmte Ionenaustauscher unter Vermeidung von Blasenbildung zugegeben. Wenn der Flüssigkeitsspiegel unter den Einlaßschliff gesunken ist, wird der Silikonschlauch entfernt und der Teflonschlauch (UV-Detektor) angeschlossen. Die Säule wird bei konstantem Durchfluß (ca. 75 cm/h) mit ein bis zwei Bettvolumen Puffer equilibriert.

2.2.2 Probenauftrag

Die Probe wird in Puffer gelöst (ca. 100 ml/g Oligonucleotid) und über eine Schlauchpumpe aufgetragen. Probenvolumina bis 50 ml werden mit einer Spritze (Luer-Lok, Gummikolbendichtung) aufgenommen und über einen Luer Dreiwegehahn an die Saugseite der Pumpe angeschlossen; bei dieser Auftragungsart ist ein Trockenlaufen der Säule nicht möglich. Anschließend wird mit demselben Puffervolumen nachgewaschen. Durchfluß: ca. 75 cm/h.

2.2.3 Linear steigende Gradientenelution

Als Gradientenformer dienen zwei gleiche Gefäße. Das Mischgefäß A enthält den Startpuffer und wird mittels Magnetrührer langsam gerührt. Das Vorratsgefäß B enthält den Endpuffer, steht auf gleicher Höhe mit Gefäß A und ist über eine Glasrohrbrücke mit A verbunden. Linear steigende Gradienten sind grundsätzlich auf einmal anzusetzen.

2.2.4 Equilibrieren in der Säule

Voraussetzung: a) Der Endpuffer darf nicht über 0,5 M sein, b) um Verunreinigungen auf der Säule zu vermeiden, wird mit einer Vorsäule (z.B.: 6 x 1,5 cm, PD-10 von Pharmacia) gearbeitet. Die Säule wird jeweils bis zum Druckanstieg von oben und unten mit Equilibrierungspuffer gewaschen. Anschließend wird mit drei Säulenvolumina Puffer equilibriert, Durchfuß ca. 75 cm/h. Die Vorsäulenfüllung wird verworfen.

2.2.5 Regenerieren von QAE-Sephadex A-25

Man füllt eine 4 l Glasfritte zur Hälfte mit dem Ionenaustauscher und wäscht 1. mit 4 l Wasser, 2. mit 8 l 0,1 M NaOH, 3. mit Was-

ser neutral (ca. 16 l), 4. mit 4 l 2 M NaCl (gefilterte Lösung) und 5. mit Wasser chloridfrei (ca. 16 l). Der Ionenaustauscher wird mit ca. 1 l 30%igem Ethanol versetzt und bei 4°C aufbewahrt.

2.3 Gelchromatographie an Sephadex G-10 bzw. G-15 (70)

Gelchromatographiesäulen (Mitteldrucksäulen) werden analog den Ionenaustauschersäulen gepackt. Der Probenauftrag wird analog mit einer Spritze durchgeführt. Die Auftragsflüssigkeit soll möglichst konzentriert aber nicht viskos vorliegen. Max. Auftragsvolumen: 5% des Säulenvolumens (50 ml bei 80 x 4 cm Säulen). Die max. Auftragsmenge variiert bei Nucleinsäuren mit der Kettenlänge und liegt zwischen 2000 und 8000 A_{260}-Einheiten bei obiger Säule. Die Säule wird mit Wasser eluiert, Durchfluß ca. 50 cm/h ≙ ca. 600 ml/h. Das Ausschlußvolumen ist ca. 1/4 der Säulenfüllung (ca. 250 ml), Salze und Mononucleotide werden bei obiger Säule nach ca. 500 ml eluiert. Substanzen, die nach mehr als 700 ml eluiert werden, wechselwirken mit der Gelmatrix.

2.4 Puffer

2.4.1 1 M Cyclohexylammoniumacetat

0,1 mol (12,1 ml) frisch destilliertes Cyclohexylamin wird in 70 ml Wasser gelöst. Mit 50% Essigsäure wird der pH auf 8,2 bzw. 6,2 eingestellt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

2.4.2 1 M Piperidiniumacetat pH 8,2

0,1 mol (9,9 ml) frisch destilliertes Piperidin wird in 70 ml Wasser gelöst. Mit 50% Essigsäure wird der pH auf 8,2 eingestellt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

2.4.3 0,1 M Aniliniumchlorid in 0,33 M Natriumacetat pH 5,0

0,01 mol (0,82 g) Natriumacetat und 0,033 mol (3,0 ml) frisch über Zinkstaub destilliertes Anilin werden in 60 ml Wasser gelöst. Mit 2 M HCl wird der pH auf 5,0 eingestellt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

2.4.4 1 M Lysin-HCl/0,025 M $NaIO_4$ pH 8,1

0,2 mol (36,5 g) Lysin·HCl wird in 50 ml Wasser aufgerührt und der pH mit 2 M NaOH auf 8,1 eingestellt. Nachdem sich alles Lysin·HCl gelöst hat, wird der pH wieder auf 8,1 eingestellt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. 0,005 mol (1,1 g) $NaIO_4$ wird in 80 ml Wasser gelöst. Mit 2 M NaOH wird der pH auf 8,1 eingestellt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Der Puffer wird frisch hergestellt durch Mischen gleicher Volumina der obigen Lösungen.

2.4.5 0,1 M Glycin-NaOH pH 10,3

0,01 mol (0,75 g) Glycin wird in 80 ml Wasser gelöst. Mit 2 M NaOH wird der pH auf 10,3 eingestellt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

2.4.6 0,25 M Tris-HCl pH 8,6

0,025 mol (3,0 g) Tris wird in 80 ml Wasser gelöst. Mit 2 M HCl wird der pH auf 8,6 eingestellt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

2.5 Methylierung von Guanosin in RNA mit DMS und Aminolyse

75 g RNA wird in 5 l 0,2 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,0 oder in 0,2 M Dikaliumhydrogenphosphatpuffer pH 8,0 gelöst. Zu den Lösungen tropft man bei 40°C (bei pH 8,0 auch bei 0-4°C) über 8 h 100 ml DMS zu. Der pH wird stündlich kontrolliert und mit 5 M

NaOH nachgestellt. Der Reaktionsansatz wird zwei Tage bei der angegebenen Temperatur gehalten, anschließend an einer UM-10 Membrane auf ca. 300 ml konzentriert und ultrafiltriert. Die Lösungen werden eingestellt auf 10% Cyclohexylamin (pH 12,3), 10% Piperidin (pH 12,5) bzw. 10% NH_3 (pH 12,0) und für 30 min auf 50°C erwärmt. Nach Neutralisation mit 2 M HCl werden die Lösungen wieder ultrafiltriert. Die Partialhydrolysate der Spaltung bei pH 8,0 und anschließender Behandlung mit Piperidin werden an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7,5 und 3,5 (66) aufgetrennt und anschliessend desaminiert (s. 2.10).

2.6 Adenosinspaltung in RNA mit DEP und Aminolyse

Zu 2 g RNA in 200 ml 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,2 werden über 7 h 4 g DEP bei 80°C zugetropft. 3 h nach vollständiger Lösung des DEP wird der Ansatz an einer UM-10 Membrane ultrafiltriert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wird gelöst in 50 ml 0,2 M Aniliniumacetat pH 5,0 und 5 h auf 30°C erwärmt bzw. in 10%igem NH_3 (pH 12,0) oder 10%igem Piperidin (pH 12,5) 15 h bei 20°C stehengelassen. Mit 2 M HCl wird neutralisiert und anschließend ultrafiltriert. Die RNA-Partialhydrolysate des mit Piperidin behandelten Ansatzes werden an QAE-Sephadex A-25 bei pH 7,5 chromatographisch aufgetrennt.

2.7 Photodynamische Oxidation von Purinbasen in RNA mit Methylenblau und Riboflavin

2 g RNA, gelöst in 2 l 5 mM Natriumacetatpuffer pH 6,0 und 10^{-5} M Riboflavin bzw. in 2 l 10 mM Tris-HCl Puffer pH 8,5 und $3 \cdot 10^{-5}$ M Methylenblau wird in einem DC-Glastank bestrahlt: 500 W Flutlichtlampe in 20 cm Abstand, bestrahlte Fläche 400 cm^2. 30 min vor und während der Bestrahlung wird mit einer Gaseinleitungsfritte O_2 durch die Flüssigkeit geleitet. Die Reaktionstemperatur wird durch Wasserkühlung bei 20-25°C gehalten. Nach 20 h Belichtung wird 1/10 des Reaktionsansatzes konzentriert, an einer Sephadex G-15 Säule (80x4 cm) entsalzt und die UV-Verhältnisse bestimmt.

2.8 Enzymatische Partialhydrolyse der RNA mit RNase T_1 und chromatographische Trennung (Schritt I. in Schema 3) des Partialhydrolysates (48)

In 4,5 l Wasser werden unter Rühren nacheinander gelöst: 30,29 g (250 mmol) Tris, 2,92 g (10 mmol) EDTA und 30,00 g RNA. Mit 2 M HCl wird auf pH 7,3 eingestellt und mit Wasser auf 5 l aufgefüllt. Zu dieser Lösung gibt man 0,1 ml (≙ 0,83 mkat) Ribonuclease T_1, verschließt mit Parafilm und erwärmt unter leichtem Rühren auf 37°C. Alle 24 h werden dem Ansatz 5 ml entnommen und an einer Sephadex G-15 Säule (80x4 cm) chromatographiert. Durch Bestimmung des Verhältnisses der A_{260}-Einheiten des abgetrennten Gp zur aufgetragenen Menge wird die Spaltungsausbeute bestimmt. Sobald die Spaltung stagniert (ca. 3. Tag), wird die Lösung an einer UM-10 Membrane auf ca. 1 l konzentriert, mit 25 mM Tris-HCl pH 7,5 auf 2 l verdünnt und dann auf eine QAE-Sephadex A-25 Säule (75x8 cm) aufgepumpt (Schritt I. in Schema 3). (Zwei Ansätze können zusammen an einer Säule chromatographiert werden.) Der Durchfluß beträgt 1,5 l/h. Linear steigender NaCl-Gradient: 25 l 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) im Mischgefäß; 25 l 0,3 M NaCl, 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) im Vorratsgefäß. Die mit diesem Gradienen eluierten niedermolekularen Fragmente werden verworfen. Die weitere Elution der Säule erfolgt in drei Stufen, wozu die folgenden ebenso gepufferten Lösungen: 10 l 0,3 M NaCl, 20 l 0,5 M NaCl, 3 l 1 M NaCl verwendet werden. Die Fraktionen der jeweiligen Stufen werden am Rotationsverdampfer konzentriert bis Salz ausfällt, durch Ultrafiltration an einer UM-10 Membrane entsalzt, lyophilisiert und ergeben, gemittelt aus sieben Ansätzen, folgende Mengen an RNA-Fragmenten:

Fraktion	Menge		
	in g	Streuung	in A_{260}-Einheiten
0,3 M	3,3	2,6- 3,6	52-110.000
0,5 M	9,0	8,2-10,0	250-300.000
1 M	1,3	0,6- 1,5	19- 40.000

2.9 Enzymatische Spaltung der RNA-Fragmente der 0,3 M-, 0,5 M- und 1 M Fraktion aus 2.8 mit RNase U_2 (51) zu Oligopyrimidin-nucleotid-3'-purinnucleotiden

2,86 ml (50 mmol) Eisessig in 950 ml Wasser werden mit ca. 13 ml 2 M NaOH auf pH 4,5 eingestellt und die Lösung mit Wasser auf 1 l aufgefüllt. In diesem Puffer werden nacheinander 0,58 g (2 mmol) EDTA und 5,00 g RNA-Fragmente (nach RNase T_1-Spaltung) der jeweiligen Fraktion gelöst. Zu dieser Lösung gibt man 0,1 ml (≙ 6,7 µkat) Ribonuclease U_2, verschließt mit Parafilm und erwärmt unter leichtem Rühren auf 37°C. Nach 72 h und alle weiteren 24 h werden dem Ansatz 5 ml entnommen und an einer Sephadex G-15 Säule (80 x 4 cm) zur Ermittlung der Spaltungsausbeute an Ap/Gp chromatographiert. Sobald die Spaltung stagniert (4.-8. Tag), wird die Lösung durch Ultrafiltration an einer UM-10 Membrane auf ca. 300 ml konzentriert, entsalzt, lyophylisiert und erhält folgende Mengen an RNA-Fragmenten.

Fraktion	Menge			Mittelwert aus
	in g	(in %)	in A_{260}-Einheiten	
0,3 M	3,7	(74)	81.000	5 Ansätzen
0,5 M	3,9	(78)	86.000	13 Ansätzen
1 M	4,1	(82)	88.000	2 Ansätzen

2.9.1 Chromatographische Auftrennung der RNase U_2-gespaltenen 1 M Fraktion und erneute RNase U_2-Spaltung

7,3 g der RNase U_2-gespaltenen 1 M Fraktion (aus dem RNase T_1 Partialhydrolysat) werden in 500 ml 25 mM Tris-HCl pH 7,5 gelöst und auf eine mit gleichem Puffer äquilibrierte QAE-Sephadex A-25 Säule (60 x 5 cm) aufgepumpt (Schritt Ia. in Schema 3); Flußrate 600 ml/h. Anschließend wird die Säule im linear steigenden NaCl-Gradienten, der mit 25 mM Tris-HCl auf pH 7,5 gepuffert ist, eluiert: 5 l im Mischgefäß, 5 l 1 M NaCl im Vorratsgefäß. Das Eluat wird in drei Fraktionen gesammelt, die an einer UM-10 Membrane entsalzt und anschließend lyophilisiert werden. P I: Eluat bei 0,4 bis 0,5 M Salzlösung, P II: Eluat bei 0,5 bis 0,7 M Salzlö-

sung, P III: Eluat bei 0,7 bis 0,85 M Salzlösung. Hierbei werden die in Tabelle 10 zusammengefaßte Mengen erhalten. Die Fraktionen werden analog der Vorschrift 2.9 mit der doppelten Menge an RNase U_2 nochmal zehn Tage gespalten, anschliessend an einer UM-10 Membrane ultrafiltriert und lyophilisiert.

Tabelle 10: Isolierte Mengen der Fraktionen aus C Methoden 2.9.1.

Bezeichnung	Eluiert bei der Salzmolarität	Menge in g	Menge in A_{260}-Einheiten	Ausbeute in %
P I	0,0-0,5	1,25	20 000	17
P II	0,5-0,7	3,44	49 000	47
P III	0,7-0,85	2,56	35 000	35
P II/III*	0,5-0,85	5,7		78

* Nach erneuter Spaltung mit der doppelten Menge an RNase U_2.

2.10 Desaminierung (65) und chromatographische Auftrennung der nach der RNase U_2-Spaltung erhaltenen RNA-Fragmente

5 g RNA-Fragmente (nach der RNase U2-Spaltung) werden in 1,67 l Wasser gelöst. Zu der Lösung gibt man 90 g $NaNO_2$ und stellt mit 330 ml Eisessig auf pH 3,35 ein. Die Lösung wird alle 12 h kurz aufgerührt. Nach ca. 50 h neutralisiert man unter Kühlen mit 5 M NaOH, konzentriert an einer UM-10 Membrane auf ca. 300 ml, entsalzt, lyophilisiert und erhält folgende Mengen an RNA-Fragmenten:

Fraktion	Menge in g	Menge in %	
0,3 M	3,0	60	
0,5 M	4,2	84	(Mittelwert aus 6 Ansätzen)
1 M	4,8	96	

Bis zu 6,6 g einer Fraktion werden in 500 ml 7 M Harnstoff, 25 mM Tris-HCl pH 7,5 gelöst und auf eine QAE-Sephadex A-25 Säule (70 x 3 cm), equilibriert mit dem gleichen Puffer, aufgepumpt (Schritt

II. in Schema 3). Der Durchfluß beträgt 300 ml/h. Anschließend wird die Säule bei 55°C im linear steigenden NaCl-Gradienten eluiert: 25 l 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 7 M Harnstoff im Mischgefäß; 25 l 0,4 M NaCl, 25mM Tris-HCl (pH 7,5), 7 M Harnstoff im Vorratsgefäß. Zur Entfernung des Harnstoffes werden die Peaks (I-XI in Fig. 5) mit Wasser auf das 2,5-fache Volumen verdünnt und durch eine Fritte (0; Ø 5 cm) 5 cm hoch mit QAE-Sephadex A-25 gefüllt, gesaugt. Nach Waschen des Ionenaustauschers mit Wasser wird das Produkt mit 1 M NaCl (200 bis 400 ml) eluiert. Entsalzt wird a) bis ca. 15 000 A_{260}-Einheiten durch Gelfiltration an Sephadex G-15, b) ab ca. 15 000 A_{260}-Einheiten durch Ultrafiltration an einer UM-10 Membrane.

2.11 Abspaltung der 3'-terminalen Phosphatgruppe und chromatographische Reinigung

500 mg der jeweiligen RNA-Fragmente (Peak I-XI und Peak IV/V_b-$XI_{b4/2}$ aus 2.10 bzw. 2.12.1), gelöst in 3 ml Wasser und 2 ml 0,25 M Tris-HCl Puffer pH 8,6, werden mit 75 µl (≙ 6,9 µkat) alkalischer Phosphatase ca. 2 h bei 37°C inkubiert. Das Ende der Dephosporylierung wird an einer Partisil-10 SAX Säule (250 x 4,6 mm) ermittelt; Puffer A: 1 mM Ammoniumsulfat pH 5,0 in Formamid:Wasser 60:40 (v/v); Puffer B: A mit 240 mM Ammoniumsulfat pH 5,0; linearer Gradient von 0% B nach 99,9% B von 3. bis 28. min; Flußrate 1 ml/min; Detektion bei 280 nm. Nach Ende der Phosphatasereaktion wird der Ansatz mit Wasser auf 30 ml verdünnt und auf eine QAE-Sephadex A-25 Säule (70 x 3 cm mit Vorsäule 6 x 1,5 cm) aufgetragen (Schritt III. in Schema 3). Die Säule, die mit 25 mM Tris-HCl pH 7,5 / 50 mM NaCl equilibriert ist, wird im linear steigenden NaCl-Gradienten eluiert: 5 l 0,1 M NaCl, 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) im Mischgefäß; 5 l O,4 M NaCl, 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) im Vorratsgefäß. Längerkettige Oligonucleotide werden mit folgendem gleich gepufferten NaCl-Gradienten eluiert: 10 l 0,1 M NaCl im Mischgefäß; 10 l 0,7 M NaCl im Vorratsgefäß. Der Durchfluß beträgt 400 ml/h. Peaks bzw. Fraktionsbereiche (Peak IV_a-XI_{a4} in Fig. 6 bzw. IV/$V_{c//1}$-$XI_{c4/2/2}$ in Fig. 10) werden an Sephadex G-15 (80 x 4 cm) entsalzt und anschließend lyophilisiert.

2.12 Perjodatspaltung mit Eliminierung des 3'-terminalen Nucleosides (62)

500 mg der jeweiligen RNA-Fragmente (Peak IV_a-XI_{a4} aus 2.11) werden in 50 ml 25 mM $NaIO_4$ / 1M Lysin-HCl (pH 8,1) gelöst und auf 45°C erwärmt. Ca. alle 30 min werden 20 µl dem Reaktionsansatz entnommen und wie in 2.11 beschrieben mit Hilfe der HPLC untersucht. Sobald der zu Reaktionsbeginn entstandene Dialdehyd vollständig abgebaut ist, kühlt man den Reaktionsansatz auf ca. 20°C ab und gibt 3 ml 1 M Glykollösung zu. Nach 15 min entsalzt man die Lösung an einer Sephadex G-15 Säule (80 x 4 cm).

2.12.1

Die höhermolekulare Fraktion der Gelfiltration (ca. 200 ml) aus 2.12 (die von Salzen und niedermolekularen Spaltprodukten befreiten Oligouridylsäure-3'-phosphate) wird auf 25 mM Tris-HCl pH 7,5 und 50 mM NaCl eingestellt und unter den Bedingungen wie in 2.11 beschrieben chromatographisch an QAE-Sephadex A-25 gereinigt (Schritt IV. in Schema 3). Die Peaks (IV/V_b-$XI_{b4/2}$ in Fig. 9) werden an Sephadex G-15 (80 x 4 cm) entsalzt und anschließend lyophilisiert. Die einzelnen Peaks werden analog 2.11 dephosphoryliert und chromatographiert (Schritt V. in Schema 3).

2.13 Reinheitskontrolle und Nachreinigung mit Reversed-Phase HPLC

Aliquots der aus 2.12.1 erhaltenen Peaks ($IV/V_{c//1}$-$XI_{c4/2/2}$ in Fig. 10) werden an einer analytischen Nucleosil $7C_{18}$ Säule (250 x 4,6 mm) chromatographiert. Puffer A: 10 mM Ammoniumacetat pH 5,6, Puffer B: 10 mM Ammoniumacetat pH 5,6 in Methanol:Wasser 80:20 (v/v); linearer Gradient von 10% B nach 30% B in 25 min; Flußrate 1 ml/min; Detektion und Integration bei 260 nm. Ergibt die Integration des Elutionsprofiles, daß das Hauptprodukt weniger als 95% der A_{260}-Einheiten enthält, so werden die entsprechenden Peaks in 0,8 ml Puffer A gelöst und auf einer LiChrosorb 10 RP-18 Säule (250 x 32 mm) nachgereinigt (Schritt VI. in Schema 3). Die

Säule wird im linear steigenden Methanolgradienten eluiert. Puffer A: 10 mM Ammoniumacetat pH 5,6, Puffer B: Methanol; linearer Gradient von 5% B nach 12% B in 50 min; Flußrate 10 ml/min; Detektion bei 260 nm. Aliquots von Peaks gleicher Retentionszeit und UV-Verhältnissen die denen von Uridin entsprechen, werden gemeinsam an einer analytische Nucleosil $7C_{18}$ Säule (250 x 4,6 mm) chromatographiert. Puffer A: 10 mM Ammoniumacetat pH 5,6, Puffer B: Methanol; linearer Gradient von 8% B nach 15% B in 25 min; Flußrate 1 ml/min; Detektion bei 260 nm. Wenn nur ein Peak im Elutionsprofil erscheint, werden die entsprechenden Substanzen vereinigt, auf 1/4 des Volumens eingeengt und anschließend lyophilisiert. Zur vollständigen Entfernung des Ammoniumacetatpuffers wird das Lyophilisat in 10 ml Wasser gelöst und erneut lyophilisiert. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis das Lyophilisat leichtflockig ist.

2.14 Kontrolle der Kettenlänge und der Nucleosidzusammensetzung durch enzymatischen Abbau und HPLC

Ca. 3 A_{260}-Einheiten der jeweiligen Oligouridylsäure werden in 30 µl Wasser, 20 µl 0,25 M Tris-HCl (pH 8,1), 10 µl 0,1 M $MgCl_2$ gelöst und mit 10 µl Phosphodiesterase aus Schlangengift (Crotalus durissus) 1-2 h bei 37°C incubiert. Anschließend werden 10 µl des Reaktionsansatzes an einer Nucleosil $7C_{18}$ Säule (100 x 4,6 mm) chromatograpiert. Puffer A: 50 mM Ammoniumacetat pH 5,6, Puffer B: 50 mM Ammoniumacetat pH 5,6 in Methanol:Wasser 80:20 (v/v); linearer Gradient von 0% B nach 20% B von 1. bis 15. min; Flußrate 1 ml/min; Detektion und Integration bei 260 nm. Der Reaktionsansatz wird nach Zugabe von 5 µl Phosphatase noch ca. 30 min bei 37°C inkubiert. Anschießend werden wieder 10 µl dem Reaktionsansatz entnommen und unter den oben beschriebenen Bedingungen chromatograpiert.

D Diskussion

Mit dieser Arbeit wird gezeigt, daß eine Isolierung homologer Uridylsäuren in präparativen Mengen aus RNA möglich ist. Die Analyse der Spaltung sowie die Reinheitskontrolle der Spaltungsprodukte kann einfach und schnell durch Bestimmung der UV-Verhältnisse und mit HPLC durchgeführt werden. Von Vorteil bei der Isolierung von poly(U) ist, daß Cytidin durch Desaminierung in Uridin überführt werden kann und eine selektive Abspaltung der Cytidineinheiten daher entfällt. Eine chemische Partialhydrolyse, Abspaltung der Purinbasen im sauren Milieu (Ameisensäure/Diphenylamin), wie sie bei der DNA angewendet wird (30,71), ist bei der RNA nicht möglich. Die bei Sequenzanalysen der RNA angewendete gezielte chemische Hydrolyse von modifizierten Basen (26,38) scheidet auch aus, da die Modifizierung in RNA nicht vollständig verläuft und dazu störende Nebenreaktionen eintreten. Grundsätzlich entstehen bei einer chemischen Modifikation der RNA zur selektiven Abspaltung von Basen mehr Nebenprodukte als bei entsprechenden Reaktionen mit DNA (16). Ebenso unvollständig verläuft mit VIS die photochemische Spaltung von Guanosin und Adenosin mit Hilfe der Farbstoffe Methylenblau bzw. Riboflavin als Energieüberträger (42,43,45). Ohne störende Nebenreaktionen und praktisch vollständig verläuft die, auch zur RNA-Sequenzanalyse eingesetzte enzymatische Spaltung mit den RNasen T_1 und U_2 (48-51).

Mit enzymatischen Spaltungen lassen sich aus der RNA auch andere Sequenzen isolieren. Als Beispiele seien hier die Spaltungen an Pyrimidinnucleotiden der RNA mit RNase A (...Yp/N...) (72), an Cytidylsäure mit RNase CL3 (...Cp/N...) (73), an Adenylsäure mit RNase U_2 in 8 M Harnstoff (...Ap/N...) (74) und an der 5'-Phosphoesterbindung von Adenosin und Uridin (...Np/A... und ...Np/U...) mit der Nuclease S7 (73) genannt. In Kombination mit der enzymatischen Dephosphorylierung und der Eliminierung des 3'-Nucleosides mit IO_4^- sollten sich auch andere homologe Sequenzen isolieren lassen: Oligoguanylsäure mit RNase A, RNase U_2 in 8 M Harnstoff, IO_4^-; Oligoadenylsäure mit RNase A, RNase T_1, IO_4^-

sowie Oligocytidylsäure mit RNase U_2, Nuclease S7 und limitierter Spaltung mit Phosphodiesterase aus Kalbsmilz.

Die Isolierung von definierten RNA-Sequenzen durch enzymatische Spaltung der RNA und chromatographische Aufarbeitung der Partialhydrolysate hat gegenüber der chemischen Synthese den Vorteil, daß die Spaltungen sich in jedem für chromatographische Arbeiten ausgelegten Labor einfach durchführen lassen. Die chemische Synthese von RNA ist wesentlich schwieriger durchzuführen und wird daher nur von wenigen Experten beherrscht.

Nachteilig bei der enzymatischen Spaltung sind einerseits die höheren Kosten der Reagenzien und andererseits die Eigenschaft des Enzyms, die unerwünschten Nucleoside nicht aus der RNA herauszuspalten, sondern nur einen Kettenbruch nach dem 3'-Phosphat des abzuspaltenden Nucleotides durchzuführen. Das verbleibende 3'-terminale Nucleotid muß dann durch Abspalten des terminalen Phosphates mit alkalischer Phosphatase und anschließender Oxidation der Ribose mit $NaIO_4$ und Lysin eliminiert werden. Der Nachteil der wesentlich aufwendigeren enzymatisch/chemischen Spaltung kehrt sich zum Vorteil um, da nach jeder enzymatischen wie chemischen Reaktion eine chromatographische Reinigung möglich ist und somit eine hohe Reinheit der Homologen erreicht werden kann. Auf diese Weise können HPLC-saubere Uridylsäuren durch Abbau technischer RNA erhalten werden. Der Versuch, einen Reinigungsschritt auszulassen, z.B. die Phosphatasereaktion sofort an die RNase U_2-Spaltung anzuschließen, oder die Phosphatasereaktion sofort nach der Perjodat-Spaltung durchzuführen, ergab deutlich verunreinigtere Produkte, die in weiteren Reaktionen niedrigere Ausbeuten brachten und deren Reinigung teilweise nicht mehr möglich war.

Durch Desaminierung der RNA wird die Zahl der Basen von vier auf drei verringert und somit die chromatographische Auftrennung verbessert. Die Desaminierung wird zweckmäßigerweise aber erst nach der RNase U_2-Behandlung durchgeführt, da RNase U_2 nur die ...Ap/N...- und langsamer die ...Gp/N...-Bindungen, nach Inosin

und Xanthosin, die nach der Desaminierung auftreten, aber nur in untergeordnetem Maße und nicht vollständig spaltet (51). Die Alternative, nach der RNase T_1-Spaltung zu desaminieren und anschließend mit 10-fach höherer Konzentration erneut mit RNase T_1 zu spalten, wurde nach unvollständig verlaufenem Testansatz nicht weiter verfolgt. Eventuell verläuft durch Basenpaarungseffekte (Inosin wirkt als Wobbelbase (75)) die Spaltung nicht vollständig. Auch werden, bei der ersten RNase T_1-Spaltung eventuell verbliebene, ...GpN...-Sequenzen durch die Desaminierung in ...XpN... überführt, die dann nur noch langsam gespalten werden. Obwohl RNase U_2 adenosin- und guanosinspezifisch spaltet, wird aus zwei Gründen zuerst mit RNase T_1 "vorgespalten": RNase T_1 spaltet, wenn auch deutlich langsamer, ebenso hinter Inosin- und Xanthosinresten und RNase T_1 ist um den Faktor 100 preiswerter als RNase U_2. Die RNase T_1-Spaltung reduziert die weiter zu spaltende Menge an RNA-Fragmenten um ca. 60% und erhöht außerdem die Effizienz der RNase U_2-Spaltung, da niedermolekulare RNA schneller gespalten wird (50).

Die Aufarbeitung der 0,3 M Fraktion aus der Partialhydrolyse mit RNase T_1 zeigt, daß das längste hierin enthaltene Oligomere die Zusammensetzung Y-Y-Rp hat, woraus U_2 als einzig mögliches Endprodukt resultiert. Da U_2 auch aus der 0,5 M Fraktion erhalten wird, ist eine Aufarbeitung der 0,3 M Fraktion aufgrund der jetzigen Kenntnisse nicht sinnvoll.

Die RNase U_2-Spaltung verläuft bei der 1 M Fraktion langsamer als bei den niedermolareren Fraktionen. Nach der Aufarbeitung enthalten die einzelnen Peaks deutlich mehr Verunreinigungen als die entsprechenden Peaks der 0,5 M Fraktion. Da bei einer chromatographischen Auftrennung (linear steigender Gradient 0 nach 1 M NaCl, pH 7,5) der RNase U_2-gespaltenen 1 M Fraktion ab Salzstärke 0,7 M die Farbe des Eluates von hellgelb nach braun wechselt, kann angenommen werden, daß ab dieser Salzstärke Verunreinigungen mit eluiert werden, die durch Assoziation mit den Nukleinsäuren die chromatographische Reinigungswirkung, wie auch die enzyma-

tische Spaltung der Oligonucleotide vermindern. Somit ist ein vereinfachter Trennungsgang vorzuziehen, in dem nur noch eine Fraktion, 0,4 bis 0,7 M NaCl, nach der RNase T_1-Spaltung weiterverarbeitet wird.

Die präparative Reinigung der Oligonucleotide mit HPLC an reverser Phase zeigt, daß die mit Ionenaustauschchromatographie gereinigten Produkte teilweise neben Verunreinigungen noch hohe Anteile an Homologen enthalten. Da poly(U) erst unter 15°C eine Sekundärstruktur ausbildet (76,77), kann dieser Effekt nur mit Basenstapelung (78) erklärt werden. Dieser Effekt wird mit organischen Lösungsmitteln an reverser Phase aufgehoben.

E Zusammenfassung

Oligouridylsäuren mit bis zu 8 Monomereinheiten werden durch enzymatische und chemische Abbaureaktionen aus RNA in Mengen von 1 bis 275 mg gewonnen. Die Verwendung von Enzymen ist wegen ihrer hohen Selektivität und fast 100%igen Spaltungsausbeute der chemischen RNA-Spaltung vorzuziehen. Die Kinetik der RNase-Spaltungen wird gelchromatographisch an Sephadex G-15 verfolgt. Nach Spaltung der RNA neben G und A mit den RNasen T_1 und U_2 werden durch Desaminierung U,C-Sequenzen in reine U-Sequenzen überführt. Alle so dargestellten Oligonucleotide haben die Sequenz $U_n(I/X)p$. Die endständigen ...p(I/X)p-Reste werden mit alkalischer Phosphatase, Perjodat-Spaltung mit β-Eliminierung induziert durch Schiffsche Basen und erneut alkalischer Phosphatase abgebaut. Die Kinetik der Phosphatase Reaktionen und der chemischen Spaltung wird mittels HPLC an Partisil-10 SAX (Anionenaustauscher) verfolgt. Die Produkte werden mit HPLC an reverser Phase untersucht und ggf. nachgereinigt. Die HPLC-Reinheit der isolierten Oligouridylsäuren ist größer 92%, bei U_8 86%. Um diese hohe Reinheit zu erzielen, werden nach jeder Spaltung die RNA-Fragmente chromatographisch an QAE-Sephadex A-25 getrennt und dann erst einzeln weiteraufgearbeitet. Der hohe Anteil an unbekannten Verunreinigungen einer technischen RNA erfordert diesen chromatographischen Aufwand.

F Literatur

1 S.S. Jones, B. Rayner, C.B. Reese, A. Ubasawa und M. Ubasawa, Tetrahedron, 36 (1980) 3075.

2 E. Ohtsuka, M. Ikehara und D. Söll, Nucleic Acids Res., 10 (1982) 655.

3 J.H. van Boom und C.T.J. Wreesman, in M.J. Gait (Herausgeber), Oligonucleotide synthesis, IRL Press, Oxford, 1985, p. 153.

4 E. de Vroom, A. Fidder, J.E. Marugg, G.A. van der Marel und J. H. van Boom, Nucleic Acids Res., 14 (1986) 5885.

5 C.B. Reese, Tetrahedron, 34 (1978) 3143.

6 M.H. Caruthers, in H.G. Gassen und A. Lang (Herausgeber), Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments, Verlag Chemie, Weinheim, 1982, p. 71.

7 W. Pfleiderer, Kontakte (Merck), 2 (1983) 3.

8 T. Tanaka, S. Tamatsukuri und M. Ikehara, Nucleic Acids Res., 14 (1986) 6265.

9 T. Godefroy-Colburn und M. Grunberg-Manago, in P.D. Boyer (Herausgeber), The Enzymes, Vol. VII, Academic Press, New York, 3. Auflage, 1972, p. 533.

10 U.Z. Littauer und H. Soreq, in P.D. Boyer (Herausgeber), The Enzymes, Vol. XV, Part B, Academic Press, New York, 3. Auflage, 1982, p. 517.

11 G. Kaufmann, M. Fridkin, A. Zutra und U.Z. Littauer, Eur. J. Biochem., 24 (1971) 4.

12 R.E. Thach, in G.L. Cantoni und D.R. Davies (Herausgeber), Procedures in Nucleic Acid Research, Harper und Row, New York, 1967, p. 520.

13 C.B. Klee, J. Biol. Chem., 244 (1969) 2558.

14 O.C. Uhlenbeck und R.I. Gumport, in P.D. Boyer (Herausgeber), The Enzymes, Vol. XV, Part B, Academic Press, New York, 3. Auflage, 1982, p. 31.

15 D. Beckett und O.C. Uhlenbeck, in M.J. Gait (Herausgeber), Oligonucleotide synthesis, IRL Press, Oxford, 1985, p. 185.

16 N.K. Kochetkov und E.I. Budovskii, Organic Chemistry of Nucleic Acids, Plenum Press, London, 1971, Ch. 1, 5, 7, 8, 10, 11.

17 H. Schott und H. Watzlawick, J. Chromatogr., 196 (1980) 43.
18 H. Schott, Macromol. Chem., 182 (1981) 2015.
19 H. Schott, in H.G. Gassen und A. Lang (Herausgeber), Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments, Verlag Chemie, Weinheim, 1982, p. 103.
20 H. Schott, H.D. Meyer und E. Bayer, J. Chromatogr., 280 (1983) 297.
21 H. Schott und H. Schrade, J. Chromatogr., 284 (1984) 381.
22 H. Schott, J. Chromatogr., 284 (1984) 409.
23 G.W. Rushizky und H.A. Sober, J. Biol. Chem., 237 (1962) 2883.
24 L.W. McLanghlin, F. Cramer und M. Sprinzl, Anal. Biochem., 112 (1981) 60.
25 R.W. Holley, Angew. Chem., 81 (1969) 1039.
26 S. Bertram, Kontakte (Merck), 2 (1981) 39.
27 T. Uchida und F. Egami, J. Biochem. (Tokyo), 57 (1965) 742.
28 H.A. Sober, Handbook of Biochemistry, The Chemical Rubber Co., 2. Auflage, 1970, Ch. G.
29 Schwarz BioResearch 5'-Nucleotides Specifications, Firmenmitteilung.
30 H. Schott und M. Schwarz, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 358 (1977) 949.
31 A.M. Maxam und W. Gilbert, Methods Enzymol., 65 (1980) 499.
32 P. Brookes und P.D. Lawley, Biochem. J., 80 (1961) 496.
33 P.D. Lawley und P. Brookes, Biochem. J., 89 (1963) 127.
34 E. Kriek und P. Emmelot, Biochim. Biophys. Acta, 91 (1964) 59.
35 A.M. Michelson und M. Grunberg-Manago, Biochim. Biophys. Acta, 91 (1964) 92.
36 F. Pochon und A.M. Michelson, Biochim. Biophys. Acta, 149 (1967) 99.
37 B. Singer und H. Fraenkel-Conrat, Biochemistry, 8 (1969) 3260.
38 D.A. Peattie, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 76 (1979) 1760.
39 A.C. Lo und R.N. Nazar, FEBS Letters, 131 (1981) 41.
40 A. Vincze, R.E.L. Henderson, J.J. McDonald und N.J. Leonard, J. Am. Chem. Soc., 95 (1973) 2677.
41 L. Ehrenberg, I. Fedoresak und F. Solymosy, Prog. Nucleic Acid Res., 16 (1976) 189.

42 M.I. Simon und H. van Vunakis, Arch. Biochem. Biophys., 105 (1964) 197.
43 A. Tsugita, Y. Okada und K. Uehara, Biochim. Biophys. Acta, 103 (1965) 360.
44 K.S. Sastry und M.P. Gordon, Biochim. Biophys. Acta, 129 (1966) 42.
45 L.A. Waskell, K.S. Sastry und M.P. Gordon, Biochim. Biophys. Acta, 129 (1966) 49.
46 N.K. Kochetkov und E.I. Budovskii, Organic Chemistry of Nucleic Acids, Plenum Press, London, 1971, Ch. 12.
47 Boehringer Mannheim, Biochemicals for Molecular Biology, Gebr. Parcus KG, München, 1985, p. 39.
48 F. Egami, K. Takahashi und T. Uchida, in J.N. Davidson und W. E. Cohn (Herausgeber), Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. 3, Academic Press, New York, 1964, p. 59.
49 K. Takahashi, J. Biochem. (Tokyo), 67 (1970) 833.
50 T. Arima, T. Uchida und F. Egami, Biochem. J., 106 (1968) 601, 609.
51 T. Uchida, T. Arima und F. Egami, J. Biochem. (Tokyo), 67 (1970) 91.
52 R.K. Morton, in M. Florkin und E.H. Stotz (Herausgeber), Comprehensive Biochemistry, Vol. 16, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1965, p. 55.
53 Biochemica, Merck, Darmstadt, p. 45.
54 Organikum, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (DDR), 15. Auflage, 1977, p. 459.
55 P.R. Whitefeld und R. Markham, Nature, 171 (1953) 1151.
56 D.M. Brown, M. Fried and A.R. Todd, J. Chem. Soc., (1955) 808.
57 D.M. Brown, M. Fried und A.R. Todd, J. Chem. Soc., (1955) 2206.
58 H.C. Neu und L.A. Heppel, J. Biol. Chem., 239 (1964) 2927.
59 P.R. Whitefeld, Biochim. Biophys. Acta, 108 (1965) 202.
60 A. Steinschneider und H. Fraenkel-Conrat, Biochemistry, 5 (1966) 2729, 2735.
61 H.L. Weith und P.T. Gilham, J. Am. Chem. Soc., 89 (1967) 5473.
62 J.X. Khym und M. Uziel, Biochemistry, 7 (1968) 422.

63 C.-T. Yu und P.C. Zamecnik, Biochim. Biophys. Acta, 45 (1960) 148.
64 K. Takahashi und S. Moore, in P.D. Boyer (Herausgeber), The Enzymes, Vol. XV, Part B, Academic Press, New York, 3. Auflage, 1982, p. 458.
65 H.S. Shapiro und E. Chargaff, Biochemistry, 5 (1966) 3012.
66 H. Schott und M. Schwarz, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 359 (1978) 617.
67 G.W. Rushizky, C.A. Knight und H.A. Sober, J. Biol. Chem., 236 (1961) 2732.
68 H. Schott und H. Eckstein, J. Chromatogr., 296 (1984) 363.
69 Pharmacia Fine Chemicals, Ion Exchange Chromatography, Rahms i Lund, 1983.
70 Pharmacia Fine Chemicals, Gelfiltration, Rahms i Lund, 1984.
71 K. Burton, Methods Enzymol., 12 a (1967) 222.
72 D.M. Brown und A.R. Tood, in E. Chargaff und J.N. Davidson (Herausgeber), The Nucleic Acids, Vol. 1, Academic Press, New York, 1955, p. 409.
73 G. Krupp und H.J. Gross, Nucleic Acids Res., 6 (1979) 3481.
74 H. Donis-Keller, Nucleic Acids Res., 4 (1977) 2527.
75 B. Levin, Genes II, John Wiley & Sons, New York, 1985, p. 128.
76 A.M. Michelson, J. Massoulié und W. Guschlbauer, in J.N. Davidson und W.E. Cohn (Herausgeber), Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. 6, Academic Press, New York, 1967, p. 83.
77 W. Guschlbauer, Nucleic Acid Structure, Springer Verlag, Berlin, 1976, p. 71.
78 A.M. Michelson und C. Monny, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 56 (1966) 1528.
79 G. Gauglitz, Praktische Spektroskopie, Attempto Verlag, Tübingen, 1983, S. 63.
80 H. Schott, J. Chromatogr., 237 (1982) 429.

Meine akademischen Lehrer waren:

E. Bayer, H. Eckstein, G. Gauglitz, F. Gönnenwein, G. Häfelinger, H. Hägenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, U. Kunze, D. Krug, P. Kraus, E. Lindner, I. P. Lorenz, H. Mauser, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, A. Rieker, W. Rundel, V. Schurig, F. F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, H. Suhr, W. Voelter, W. Zeil.

L E B E N S L A U F

Name	Heidereich v. Biedersee
16. Sept. 1956	geboren in Tübingen als Sohn des Diplom-Chemikers Hansheide v. Biedersee und dessen Ehefrau Margarete, geb. Sojka
April 1963 bis Nov. 1966	Besuch der Grundschule in Tübingen
09. Dez. 1966 bis 27. Mai 1975	Besuch des Keplergymnasiums Tübingen
04. Juni 1975	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
Okt. bis Dez. 1975	Studium der Physik an der Universität Tübingen
ab Dez. 1975	Studium Chemie Diplom an der Universität Tübingen
Dez. 1983	mündliche Diplomprüfung
Jan. 1984 bis Sept. 1984	Diplomarbeit: "Chemische Synthese von Oligomeren der Desoxyribouridylsäure nach der Triestermethode"
Jan. 1985 bis April 1987	Experimenteller Teil der Doktorarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Schott "Präparative Isolierung von Oligoribouridylsäuren aus RNA-Hydrolysaten"
Familienstand	verheiratet mit Iris, geb. Graule; zwei Kinder.